

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

Andressa Mariana Saldanha Elias

**TOXOCAROSE CAUSADA POR *Toxocara canis*: uma perspectiva biopsicológica em
modelo murino**

Belo Horizonte
2022

Andressa Mariana Saldanha Elias

TOXOCAROSE CAUSADA POR *Toxocara canis*: uma perspectiva biopsicológica em modelo murino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Co-orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri

Belo Horizonte

2022

043

Elias, Andressa Mariana Saldanha.

Toxocarose causada por *Toxocara canis*: uma perspectiva biopsicológica em modelo murinho [manuscrito] / Andressa Mariana Saldanha Elias. – 2022.

153 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger. Co-orientador: Dr. Leonardo de Oliveira Guarnieri.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Toxocaríase. 3. *Toxocara canis*. 4. Biomarcadores. 5. Histopatologia. 6. Camundongos Endogâmicos BALB C. I. Geiger, Stefan Michael. II. Guarnieri, Leonardo de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COLEGIADO DO
PROGRAMA DE GRADUAÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO 433/02/2022

**TÍTULO: " TOXOCAROSE CAUSADA POR TOXOCARA CANIS UMA PERSPECTIVA
BIOPSIOLÓGICA EM MODELO MURINO"**

ALUNA: ANDRESSA MARIANA SALDANHA ELIAS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: HELMINTOLOGIA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **dezoito de março de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes doutores:

Cleiton Lopes Aguiar

UFMG

Lílian Lacerda Bueno

UFMG

Leonardo de Oliveira Guarnieri - Coorientador

UFMG

Stefan Michael Geiger - Orientador

Belo Horizonte, 18 de março de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 18/10/2022, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1839791** e o código CRC **4A7DE50F**.

In memoriam da minha tia e madrinha
**Lourdes Maria de Souza Saldanha, por ter
incentivado a minha busca por
conhecimento!**

Agradecimentos

Agradeço *in memoriam* especialmente a minha tia e madrinha Lourdes que foi peça fundamental para que eu continuasse em busca de conhecimento e buscasse os meus sonhos. O sono de ser mestre foi possível por conta dela, com a alegria do título veio a tristeza de sua perda no mesmo ano, mas permanece o sentimento de busca continuo por conhecimento!

Agradeço a minha família pelo apoio e presença, em especial a minha mãe e meu irmão Alberto Saldanha. A Valéria Oliveira (Val), amiga de longa data e pequeno anjinho, que esteve comigo desde o início da minha jornada na formação em psicologia, que foi companheira no curso de biologia e de laboratório. Aos meus amigos de longa data Samira Oliveira e Diogo Nunes. A amiga que fiz durante o percurso acadêmico na psicologia Ayandra Tabatha. A Dona Elzira e Clara, por me escutarem e orientarem muitas das vezes, sobre melhores decisões.

Agradeço *in memoriam* a Dona Vanda, pessoa sempre disposta a ajudar, que esteve comigo até o ano dessa conquista, que sempre buscou por meio de Nossa Senhora Aparecida apresentar uma melhor visão de mundo em momentos difíceis.

Agradeço ao professor Stefan Michael Geiger, peça importante na minha formação, que me deu a oportunidade de trabalhar em seu laboratório durante 9 anos. Agradeço a paciência, as conversas, aconselhamentos e orientação, pois obtive com em todos esses anos experiências únicas que me moldaram uma melhor profissional, além de me proporcionar vasto conhecimento em parasitologia e auxiliar na minha formação científica crítica embasada na ciência.

Agradeço aos colegas de laboratório que estiveram nesse percurso de 9 anos, onde aprendi muito com cada um e os levo na minha história!

Agradeço aos professores do departamento de Parasitologia Alan Melo, Deborah Negrão-Corrêa, Grasielle Pessoa e Lilian Bueno que apresentaram forte influência em minha formação acadêmica profissional.

Agradeço ao pós-doc Fabricio e a Dr^a Laura, pelas contribuições ao meu trabalho.

Agradeço a pós-graduação em parasitologia, em especial as funcionárias Sibebe e Sumara que me auxiliam socioemocionalmente nesse trajeto.

A CAPES pelo fornecimento da bolsa.

Agradeço a oportunidade de ter participado da turma de mestrado de 2019, foram experiências únicas e lembranças de pessoas que levarei pelo resto de minha vida.

“...entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.” (Alice no País das Maravilhas – Lewis Carroll)

Resumo

Em busca de entender os efeitos da migração larval, e o processo infeccioso de maneira interdisciplinar, o objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos da infecção por *Toxocara canis* durante a fase subaguda e crônica da infecção em modelo murino BALB/c, considerando parâmetros parasitológicos, psicocomportamentais, imunopatológicos e histopatológicos da infecção. Para cumprir com o objetivo, os camundongos BALB/c foram divididos de acordo com a quantidade de ovos inoculados, grupo G100, inoculado com 100 ovos embrionados e grupo G1000, inoculado com 1.000 ovos embrionados. Como principais resultados obtidos, se destaca uma maior recuperação de larvas L3 no grupo G1000 em comparação ao grupo G100, com maior recuperação de larvas no tecido encefálico. Na avaliação psicobiológica do comportamento encontramos um comportamento tipo ansiogênico nos animais G100 e comportamento tipo ansiolítico no grupo G1000. As citocinas IL-6 e TNF- α , e a quimiocina CCL-17, marcadores esses pró-inflamatórias, serviram como marcadores secundários da infecção por *Toxocara canis*. Na avaliação histopatológica do tecido pulmonar, encontramos scores de inflamação aumentados nos animais do grupo G1000, eutanasiados tanto no tempo 14DPI como 42DPI. Já a histopatologia do tecido hepático, apresentou-se, no grupo G1000 eutanasiado no tempo 42DPI, níveis baixos de granuloma no tempo 42DPI. Enquanto a coloração usada para análise histopatológica encefálica, não detectou alterações fisiopatológicas de tecido nos animais infectados. Em conclusão, foram detectadas alterações histopatológicas e imunológicas no grupo de baixa (G100) e alta (G1000) dose de infecção por *Toxocara canis*. Quanto ao peso dos animais, encontramos ganhos de acordo com a normalidade. Porém, apenas no grupo G1000 foi possível recuperar larvas migratórias, principalmente no encéfalo. Além disso, encontramos diferenças quanto ao comportamento tipo ansioso, apresentando o grupo de baixa (G100) dose de infecção um comportamento tipo ansiolítico e o grupo de alta (G1000) dose de infecção um comportamento tipo ansiogênico, já o comportamento tipo depressivo foi encontrado na fase crônica dos animais G1000.

Palavras-chaves: Toxocarose. *Toxocara canis*. Balb/c. Psicobiologia Parasitária. Marcadores Imunológicos. Histopatologia.

Abstract

In order to understand the effects of larval migration, and the process of infection, this study aimed to analyse the effects of *T. canis* infection in BALB/c mice during the acute and chronic phases of infection. This study specifically evaluated parasitological, psychobehavioral, immunopathological and histopathological parameters during the course of infection. BALB/c mice were grouped according to the amount of inoculated eggs, group G100, with 100 embryonated eggs, and group G1000 with 1,000 embryonated eggs. Results demonstrated a higher recovery of L3 larvae from the G1000 group compared to the G100 group, with the most larvae recovered from brain tissue. In the psychobiological evaluation of behaviour we found an anxiolytic-like behaviour in the G100 animals and anxiogenic-like behaviour in the G1000 group. The evaluation of inflammatory markers showed an increase in IL-6 concentrations in infected animals at 42DPI, as well as an increase in relation to TNF- α and CCL-17 concentrations in the G1000 group. As for the histopathological evaluation of lung tissue, we found increased inflammation scores in the animals of the G1000 group at both 14DPI and 42DPI. Additionally, the histopathology of the liver tissue showed low levels of granuloma in the G1000 group at 42DPI, while the chosen staining methods for brain histopathology showed no pathophysiological tissue changes in any of the analysed groups. In conclusion, histopathological and immunological changes were detected after low (G100) and high (G1000) doses of *Toxocara canis* infection. As for the weight of the animals, we found normal weight gains in the course of infection. However, only in the G1000 group it was possible to recover migrating larvae, mainly in the brain. In addition, we found differences regarding anxiety-like behavior, with the low (G100) infection-type group presenting an anxiolytic-like behavior and the high (G1000) infection-dose group presenting an anxiogenic-like behavior, whereas the depressive-like behavior was found in the G1000 group in the chronic phase.

Keywords: Toxocarosis. *Toxocara canis*. Balb/c. Parasitic Psychobiology. Immunological Markers. Histopathology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa global de contaminação de locais públicos por ovos de <i>Toxocara canis</i>	23
Figura 2: Prevalência da infecção por <i>Toxocara</i> em cães em diferentes países	24
Figura 3: Prevalência de cães infectados por <i>Toxocara canis</i> em regiões do Brasil	26
Figura 4: Estimativa de soroprevalência da infecção por <i>Toxocara</i> no mundo	27
Figura 5: Micrografias eletrônicas de varredura de <i>Toxocara canis</i>	29
Figura 6: Estádios de desenvolvimento dos ovos de <i>Toxocara canis</i>	31
Figura 7: Vermes adultos de <i>Toxocara canis</i>	54
Figura 8: Obtenção de ovos de <i>Toxocara canis</i> e embrionamento	55
Figura 9: Verificação do desenvolvimento dos ovos de <i>Toxocara canis</i>	56
Figura 10: Caracterização da migração larval, recuperação de larvas L3 de BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i>	57
Figura 11: Órgãos de BALB/c mantidos em banho maria (37°C) para a recuperação de larvas L3 de <i>Toxocara canis</i>	58
Figura 12: Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c experimentalmente infectados com ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> realizando o teste de Neofagia	61
Figura 13: Animais BALB/c infectados com ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> realizando o teste do Nado Forçado	62
Figura 14: Vista ventral do pulmão murino	65
Figura 15: Vista ventral do fígado murino	65
Figura 16: Encéfalo murino	68
Figura 17: Larvas L3 recuperadas de tecido encefálico do grupo G1000	70
Figura 18: Fotomicrografia do pulmão de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	118
Figura 19: Fotomicrografia do fígado de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	120
Figura 20: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	122

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Representação da transmissão do <i>Toxocara canis</i> ao hospedeiro definitivo, e transmissão parasitária aos hospedeiros paratênico e acidental	35
Fluxograma 2: Delineamento experimental	51
Fluxograma 3: Delineamento dos experimentos psicobiológicos	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Carga parasitária recuperada dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	70
Gráfico 2: Carga parasitária recuperada do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i>	71
Gráfico 3: Carga parasitária recuperada dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	72
Gráfico 4: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> e animais controle sem infecção, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	76
Gráfico 5: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI, nos momentos antes e após jejum para o teste de Neofagia	78
Gráfico 6: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia	79
Gráfico 7: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI após jejum para o teste de Neofagia	80
Gráfico 8: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI antes e após jejum para o teste de Neofagia	81
Gráfico 9: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia	82
Gráfico 10: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI após jejum para o teste de Neofagia	83
Gráfico 11: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção	

7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI nos momentos antes e após jejum para o teste de Neofagia	84
Gráfico 12: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia	85
Gráfico 13: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI após jejum para o teste de Neofagia	86
Gráfico 14: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI antes e após jejum para o teste de Neofagia	87
Gráfico 15: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia	88
Gráfico 16: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, e fase crônica da infecção 42DPI após jejum para o teste de Neofagia	89
Gráfico 17: Quantidade de ração ingerida durante o teste de Neofagia pelos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	93
Gráfico 18: Tempo de latência para primeira alimentação analisados pelo teste de Neofagia em camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	98
Gráfico 19: Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	103
Gráfico 20: Latência para imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	107

Gráfico 21: Latência para imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI	111
Gráfico 22: Quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α , e da quimiocina CCL-17 em soro de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	113
Gráfico 23: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , dada por escore de inflamação para comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI	115
Gráfico 24: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar total de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , dada por escore de inflamação	116
Gráfico 25: Avaliação histopatológica semiquantitativa de granuloma pulmonar de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , dado por escore	117
Gráfico 26: Avaliação histopatológica semiquantitativa de lesão e granuloma hepático de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de <i>Toxocara canis</i> , dado por escore	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

-1TAI	Tempo Antes da Infecção
7DPI	7 Dias após a Infecção
14DPI	14 Dias após a Infecção
42 DPI	42 Dias após a Infecção
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AC	Grupo de Animais Controle
ANOVA	Análise de Variância
BALB/c	Camundongos de Pelagem Albina
CCL	Quimiocina Ligante da Família C
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte/ Minas Gerais
CDC	<i>Centers for Disease Controle and Prevention</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
G100	Grupo de Animais Infectados com 100 ovos embrionados
G1000	Grupo de Animais Infectados com 1.000 ovos embrionados
HA	Hospedeiro Acidental
HD	Hospedeiro(s) Definitivo(s)
HP	Hospedeiro(s) Paratênico(s)
HTS	Helmintos Transmitidos pelo Solo
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
L1	Larva(s) de primeiro estágio
L2	Larva(s) de segundo estágio
L3	Larva(s) de terceiro estágio
LHI	Laboratório de Helmintoses Intestinais
LMO	Larva migrans ocular
LMV	Larva migrans visceral
NNC	Núcleo de Neurociências da UFMG
NT	Neurotoxocaríase
PBS	Tampão fosfato salino
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Toxocarose encoberta ou comum
TES	<i>Toxocara</i> produtos excretores-secretores

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Th	Célula T auxiliar
Treg	Célula T reguladoras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOCAROSE.....	22
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOCAROSE CANINA.....	23
1.1.2. EPIDEMIOLOGIA DA TOXOCAROSE HUMANA.....	26
1.2. TOXOCARA CANIS.....	28
1.2.1. CICLO BIOLÓGICO.....	29
1.3. <i>TOXOCARA SPP.</i> E SEUS HOSPEDEIROS.....	34
1.3.1. TOXOCAROSE EM HOSPEDEIRO PARATÊNICO – CICLO BIOLÓGICO E ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS.....	37
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS E FISIOPATOLÓGICOS DA TOXOCAROSE HUMANA.....	38
1.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA TOXOCAROSE.....	39
1.6. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA TOXOCAROSE.....	40
1.7. PSICOBIOLOGIA.....	42
1.7.1. PSICOBIOLOGIA PARASITÁRIA.....	42
1.7.2. PSICOBIOLOGIA NA TOXOCAROSE.....	44
1.8. PREVENÇÃO A INFECÇÃO POR <i>TOXOCARA CANIS</i>	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVO GERAL.....	49
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA E MATERIAL BIOLÓGICO.....	50
4.2. DESENHO EXPERIMENTAL – ASPECTOS GERAIS.....	50
4.3. OBTENÇÃO DE ADULTOS DE <i>TOXOCARA CANIS</i>	52
4.4. OBTENÇÃO DE OVOS DE <i>TOXOCARA CANIS</i> E EMBRIONAMENTO.....	54
4.4.1. VERIFICAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DOS OVOS DE <i>TOXOCARA CANIS</i>	56
4.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL.....	57
4.6. ANÁLISE DO PROCESSO INFECIOSO POR MEIO DA RECUPERAÇÃO DE LARVAS L3.....	57
4.7. ANÁLISE DO ESTADO FISIOLÓGICO DOS ANIMAIS INFECTADOS POR MEIO DO PESO CORPORAL.....	58
4.8. IDENTIFICAÇÃO DO IMPACTO PSICOBIOLOGICO DA INFECÇÃO POR MEIO DE TESTES COMPORTAMENTAIS.....	59
4.8.1. NEOFAGIA: NOVELTY SUPPRESSED FEEDING.....	60
4.8.2. TESTE DO NADO FORÇADO.....	61
4.9. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS COMO MARCADOR DA INFECÇÃO.....	62
4.10. IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS NA INFECÇÃO POR MEIO DA HISTOPATOLOGIA.....	64
4.10.1. HISTOPATOLOGIA PULMONAR E HEPÁTICA – PROCESSAMENTO TECIDUAL EM BLOCO DE PARAFINA COM COLORAÇÃO EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	64
4.10.2. HISTOPATOLOGIA ENCEFÁLICA – PROCESSAMENTO TECIDUAL EM CRIOMICROTOMIA COM COLORAÇÃO DE NISSL.....	67
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	68
5. RESULTADOS.....	69
5.1. ANÁLISE DO PROCESSO INFECIOSO POR MEIO DA RECUPERAÇÃO DE LARVAS L3 NA FASE SUBAGUDA E CRÔNICA DA INFECÇÃO.....	69

5.2. ANÁLISE DO ESTADO FISIOLÓGICO DOS ANIMAIS POR MEIO DA ANÁLISE COMPARATIVA TEMPORAL DO PESO CORPORAL	72
5.3. IDENTIFICAÇÃO DO IMPACTO PSICOBiolÓGICO DA INFECÇÃO POR MEIO DE TESTES COMPORTAMENTAIS APLICADOS TEMPORALMENTE NAS FASES AGUDA, SUBAGUDA E CRÔNICA DA INFECÇÃO	77
5.3.1. NEOFAGIA	77
5.3.1.1. COMPARAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS NOS TEMPOS DE ANÁLISE DA INFECÇÃO ANTES DO JEJUM E APÓS O JEJUM PARA APLICAÇÃO DO TESTE DE NEOFAGIA	77
5.3.1.2. QUANTIDADE DE RAÇÃO INGERIDA DURANTE O TESTE DE NEOFAGIA	89
5.3.1.3. TEMPO DE LATÊNCIA PARA A PRIMEIRA ALIMENTAÇÃO DURANTE O TESTE DE NEOFAGIA.....	94
5.3.2. TESTE DO NADO FORÇADO.....	99
5.3.2.1. LATÊNCIA PARA O PRIMEIRO EPISÓDIO DE IMOBILIDADE APÓS CONSTÂNCIA NO NADO DURANTE O TESTE DE NADO FORÇADO	99
5.3.2.2. TEMPO TOTAL DE IMOBILIDADE NO TESTE DO NADO FORÇADO.....	104
5.3.2.3. TEMPO TOTAL DE MOBILIDADE DURANTE O TESTE DO NADO FORÇADO	108
5.4. ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS COMO MARCADOR DA INFECÇÃO	112
5.5. IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS NA INFECÇÃO POR MEIO DA DESCRIÇÃO DE ASPECTOS HISTOLÓGICOS NA FASE SUBAGUDA E CRÔNICA DA INFECÇÃO.....	114
5.5.1. HISTOPATOLOGIA PULMONAR E HEPÁTICA – PROCESSAMENTO TECIDUAL EM BLOCO DE PARAFINA COM COLORAÇÃO EM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	114
5.5.1.1. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS LESÕES PULMONARES PROVOCADAS PELA MIGRAÇÃO LARVAL DE <i>TOXOCARA CANIS</i>	114
5.5.1.2. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS LESÕES HEPÁTICAS PROVOCADAS PELA MIGRAÇÃO LARVAL DE <i>TOXOCARA CANIS</i>	119
5.5.2. HISTOPATOLOGIA ENCEFÁLICA – PROCESSAMENTO TECIDUAL EM CRIOMICROTOMIA COM COLORAÇÃO DE NISSL.....	120
6.DISSCUSSÃO	123
7.CONCLUSÃO.....	142
REFERÊNCIAS	144

1. Introdução

Infecções causadas por helmintos transmitidos pelo solo (HTS) apresentam uma alta prevalência em humanos e animais, havendo atualmente mais de um quarto da população humana infectada (Zawawi; Else, 2020). Essas infecções são causadas por nematódeos das famílias dos ascarídeos, tricurídeos, estrongilídeos e/ou ancilostomídeos (Jourdan *et al*, 2017; Hotez, 2020).

Dos HTS encontrados em crianças e adolescentes, na idade escolar, *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* são os mais prevalentes. Já, as infecções com elevação de intensidade, são causadas por *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*, possuindo correlação com o aumento da idade do hospedeiro humano. Enquanto *Strongyloides stercoralis* é encontrado em países tropicais, com uma prevalência aproximada de 40% (Zawawi; Else, 2020).

Esse aumento dos HTS apresenta relação com as alterações temporais advindas do vínculo entre humanos e animais, onde o animal, que antes exercia função de trabalho ao auxiliar no campo, proteger a casa e conter pragas e intrusos, passa por um processo sócio histórico, que o leva a exercer uma função social, como companhia (Overgaauw *et al*, 2020; Mwangi, Figueiredo, Criscitiello 2016).

Essa aproximação do humano com o animal, principalmente cães e gatos, apresenta relação direta com o anseio humano por laços socioemocionais, pois, a mera presença do animal fornece ao sujeito, que possui o sentimento de exclusão social, uma fonte de conexão psicossocioemocional (Papousek *et al*, 2020). Essa conexão entre humano e animal, se apresenta de suma importância no auxílio da saúde mental, na redução dos níveis de estresse e no auxílio da saúde física (Horowitz, 2021).

Mas, o cenário de aproximação entre humano e animal não apresenta apenas benefícios, pois infelizmente, essa aproximação, acarretou em um aumento populacional dos animais, elevando-se exponencialmente os patógenos transmitidos para os humanos (Mwangi, Figueiredo, Criscitiello, 2016). Com isso, estima-se que, 60% das doenças emergentes em humanos são originárias de animais (Overgaauw *et al*, 2020).

Nesse cenário, dentre as doenças emergentes, chama a atenção a toxocarose, que se apresenta, ignorada em meio as formulações de políticas globais a respeito de infecções causadas por HTS (Hotez, 2020; Papavasiliopoulos *et al*, 2018; Ma, *et al*, 2017), sendo listada como uma das cinco infecções parasitárias mais negligenciada em humanos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC (Janecek, *et al*, 2017; CDC, 2020).

1.1. Epidemiologia da toxocarose

O helminto *Toxocara* apresenta uma distribuição onipresente em seus hospedeiros definitivos (HD) e, portanto, é considerado um dos helmintos mais difundidos e prevalentes em nível global em hospedeiros paratênicos (HP) zoonóticos. Isso se dá, por conta de fatores amplos e complexos como, os níveis populacionais de HD e hospedeiro acidental (HA), fatores ambientais, geográficos, culturais e socioeconômicos (Macpherson, 2013). Além desses fatores, há fatores relacionados ao hospedeiro diretamente e sua suscetibilidade à infecção, como seu comportamento, sua resposta imunológica, a existência de coinfeção, sua genética, seu gênero, seus níveis nutricionais, sua idade e migração dos hospedeiros em níveis rurais e globais, que levam a toxocarose a ser reconhecida como um problema de saúde pública comum, mas negligenciado (Macpherson, 2013).

O entendimento quanto a um desses fatores é apresentado em um estudo de metanálise realizado por Rostami (*et al*, 2019), que elucidou as taxas de contaminação de locais públicos como playgrounds, parques e praias (Figura 1), por ovos de *Toxocara canis*, em nível global. O trabalho identificou 109 estudos, que abrangeram 42.797 amostras de solo de 40 países, e utilizaram métodos convencionais de diagnóstico, como a flutuação.

Dos locais públicos analisados, 21% (16 - 27%) apresentaram contaminação por ovos de *T. canis*. Desse total, o nível mais alto foi encontrado na região do pacífico ocidental, com 35% (15 - 58%) de contaminação, e o nível mais baixo nas Américas do Norte e Central, 13% (8 - 23%) de contaminação. Já em outras regiões foram encontradas taxas de contaminação de 27% (11 - 47%) na África, 25% (13 - 38%) na América do Sul, 21% (3 - 49%) no Sudeste Asiático, 18% (11 - 24%) nas regiões do Oriente Médio, Norte da África e Europa (Rostami, *et al*, 2019).

As taxas de contaminação dos locais públicos estão diretamente relacionadas a fatores climáticos e geográficos das regiões, ocorrendo maior contaminação do solo em regiões com umidade relativa do ar mais elevada, quando há comparação entre os locais com maiores longitudes e menores latitudes (Rostami, *et al*, 2019).

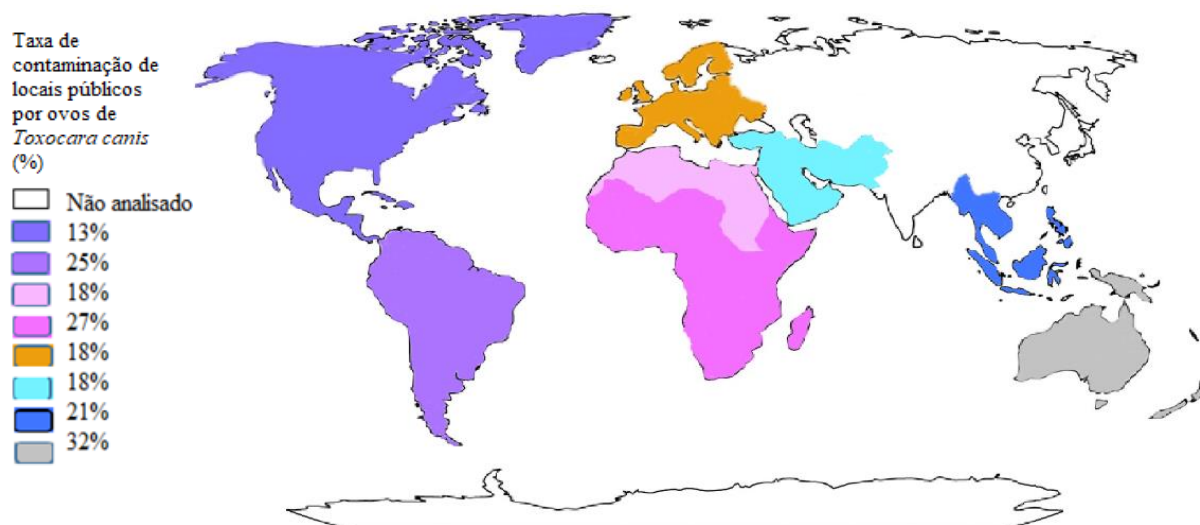


Figura 1: Taxa global de contaminação de locais públicos por ovos de *Toxocara canis*. (Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

1.1.1. Epidemiologia da toxocarose canina

Ao analisarmos o cenário epidemiológico canino em relação a toxocarose, encontramos no estudo sistemático de metanálise, que realiza uma análise de prevalência global (Figura 2), uma estimativa de 11,1% de cães infectados no mundo, sendo um total, de pelo menos, 100 milhões de cães (Rostami *et al*, 2020).

Desse total de cães infectados encontramos uma maior prevalência foi a Região do Mediterrâneo Oriental 19,2% (13,7 – 25,5%) e a de menor foi a Região do Pacífico Ocidental 6,4% (3,3 – 10,2). Dos países da América do Sul, a Argentina apresentou maior prevalência, 12,4% (10,1 – 14,9%), seguido pelo Brasil, com prevalência de 8,8% (5,5 – 12,6%).

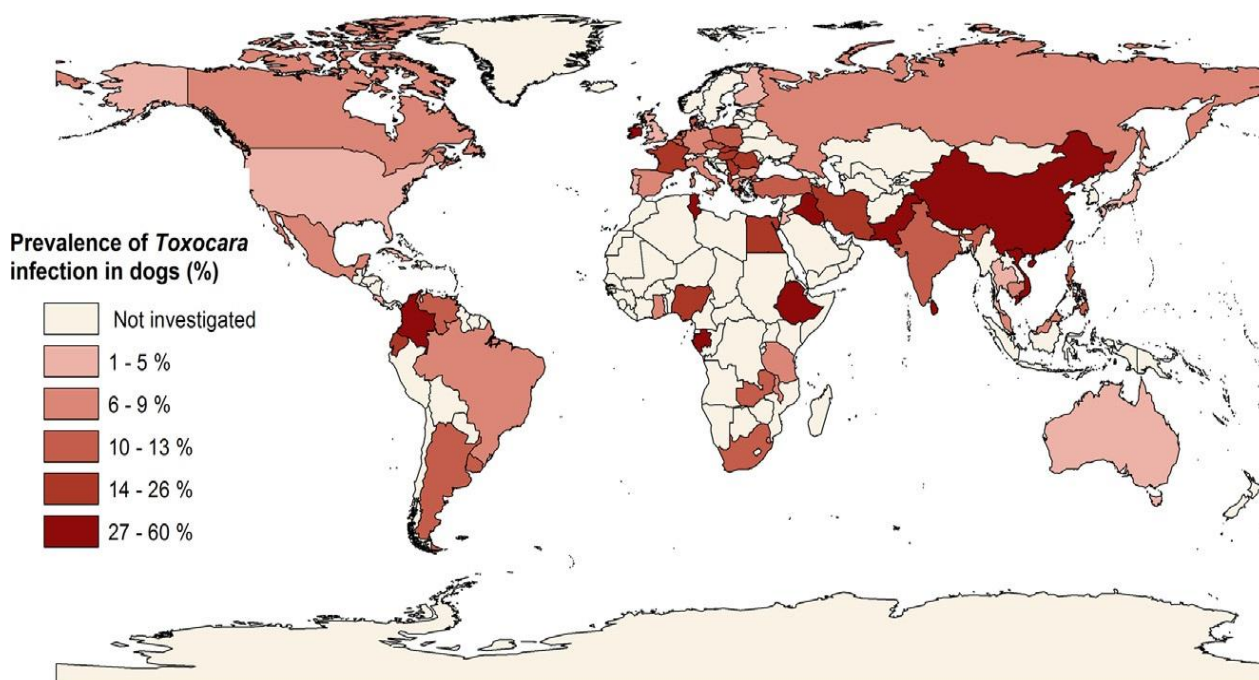


Figura 2: Prevalência da infecção por *Toxocara* em cães em diferentes países. (Fonte: Rostami *et al*, 2020)

No Brasil, Dantas-Torres (2020) realizou um estudo de revisão para analisar o cenário epidemiológico quanto a prevalência de *T. canis* em cães, o trabalho foi dividido de acordo com o método diagnóstico de análise do material. Logo, foram analisados trabalhos publicados entre os anos de 1972 a 2017, os quais foram analisados por método coprológico, enquanto trabalhos, entre os anos de 1922 a 2012, utilizaram análises por meio de necropsia dos animais.

Os exames coprológicos apresentaram prevalência de *T. canis* com variação de 0,7% a 48,9% (Figura 3A). Essa variação levou o autor a apresentar um alerta quanto a interpretação dos dados, visto que, essa variação entre os estudos está relacionada com o tamanho do N amostral, a sensibilidade dos métodos diagnósticos para detecção dos ovos, e a variação da idade da população canina. Além disso, coinfeções por outros toxocarídeos como *Toxascaris leonina*, devem ser consideradas (Dantas-Torres 2020).

Já em relação a análise por meio de necropsia, a prevalência nos estudos de *T. canis* variou de 3,2% a 71,4% (Figura 3B). Nesses estudos, essa variação está correlacionada com a média de cães infectados por outros vermes adultos, além do *T. canis*, sendo os parasitos mais prevalentes nos cães, no momento da necropsia, *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum* e o *T. canis*. No geral, as limitações nesses

estudos estão relacionadas a variação existente entre as cidades ou estados, além de, publicações com informações limitadas e de difícil acesso, por serem publicações de periódicos locais (Dantas-Torres 2020).

As variações entre as prevalências de *T. canis* em cães, é mais bem observada, em dois estudos. No estudo de Ferreira (*et al*, 2016), em que se analisou as fezes dos cães da região de São Paulo, a prevalência encontrada foi de 0,7% de *T. canis*, enquanto o estudo de Saldanha-Elias (*et al*, 2019), com cães adultos eutanasiados em Belo Horizonte - Minas Gerais encontrou-se uma prevalência de 16% de *T. canis*.

Mas, diferente desses outros estudos o trabalho de Dantas-Torres (2020) analisou outros fatores em relação a infecção dos cães. Considerando a soroprevalência e o sexo dos animais. Com isso, o autor constatou maior risco de infecção por cães machos, do que cães fêmeas, sugerindo que, os cães machos estão mais expostos ao parasito do que as fêmeas. As análises feitas, estão representadas pela Figura 3C, onde é apresentada a prevalência da infecção por *T. canis* em cães de diferentes regiões do Brasil, baseando-se nos exames fecais e dados de necropsia ao mesmo tempo, não havendo dados quanto a soroprevalência da infecção por *T. canis* nos cães vivos.

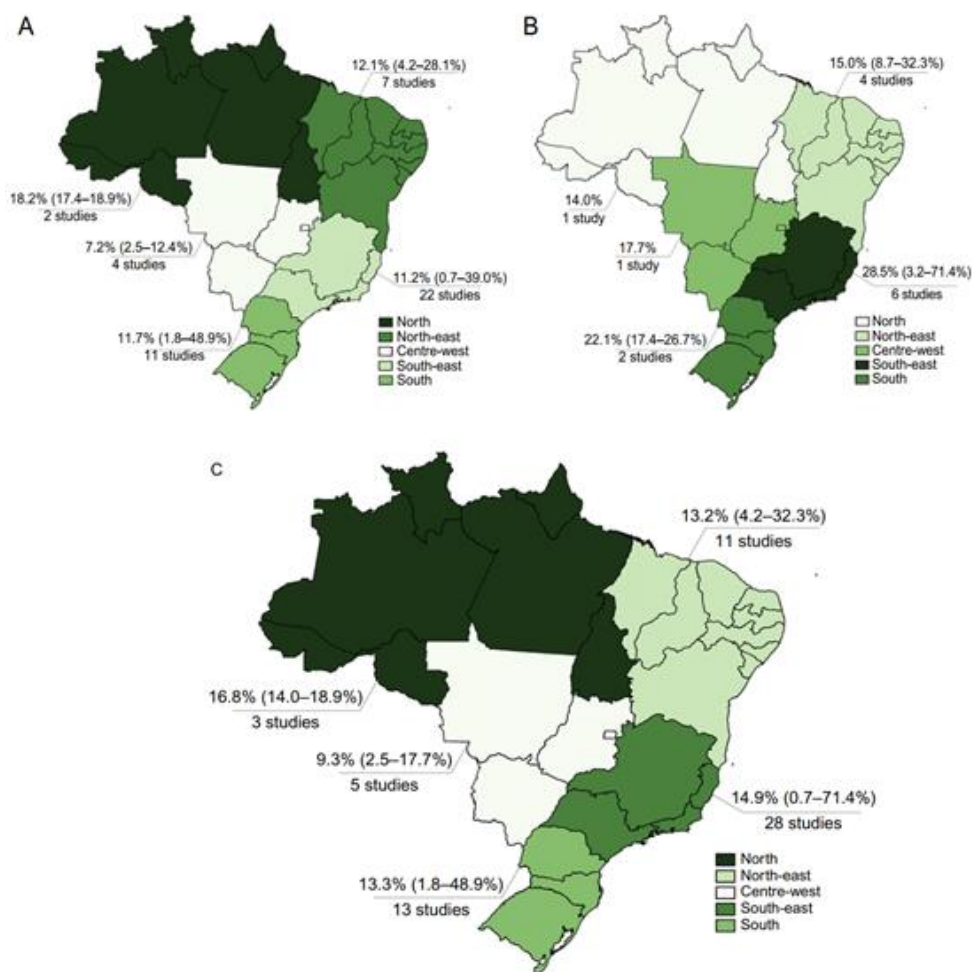


Figura 3: Prevalência de cães infectados por *Toxocara canis* em regiões do Brasil. (A) Prevalência embasada nos exames fecais. (B) Prevalência baseada nos estudos com necropsia dos cães. (C) mistura dos dois estudos. (Fonte: Dantas-Torres 2020)

1.1.2. Epidemiologia da toxocarose humana

O cenário epidemiológico humano é mais bem compreendido, pelo estudo de Rostami (*et al*, 2019), que por meio de uma revisão sistemática de metanálise, estimou a prevalência de anticorpos séricos, anti-*Toxocara*, em humanos, sendo revisados um total de 250 estudos de 71 países (Figura 4). O estudo levou a conclusão de que, 19% da população humana mundial é soropositiva para *Toxocara*, havendo uma prevalência mais alta na África 37,7% (25,7-50,6%) e a menor prevalência no Mediterrâneo Oriental 8,2% (5,1-12,0%). Prevalência medias foram encontradas no sudeste da Região Asiática 34,1% (8,5 -12,8%), Região do Pacífico Ocidental 24,2% (19,7-26,0%) e na América do Sul 27,8% (23,1-32,7%), enquanto taxas mais baixas na América do Norte 12,8 (10,0-15,8%) e Europa 10,5% (8,5-12,8%).

Além disso, o estudo considerou fatores de risco associados a soropositividade encontrada, como ser do sexo masculino, viver em áreas rurais, estar em idade juvenil, ter contato com cães, gatos ou solo, consumir carne crua e consumir água potável não tratada (Rostami *et al*, 2019).

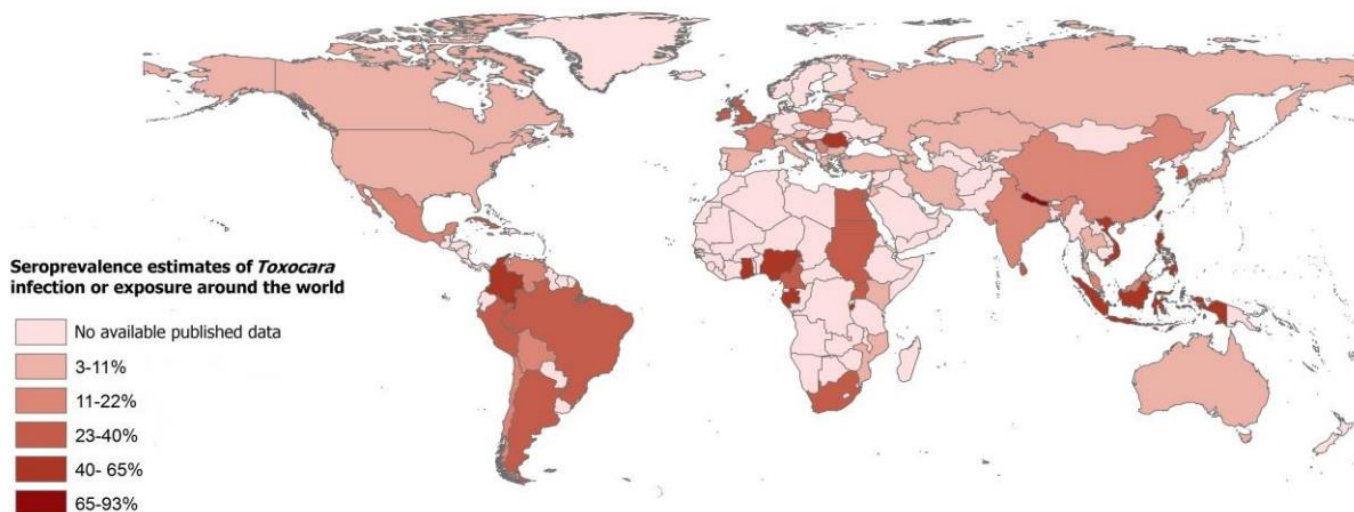


Figura 4: Estimativa de soroprevalência da infecção por *Toxocara* no mundo. (Rostami *et al*, 2019)

Já em uma análise de revisão de estudos temporal de 28 casos humanos que ocorreram entre o período de janeiro de 1985 a agosto de 2019, Fan (2020), encontrou na Europa um maior número de casos, sendo um total de 19 casos. Enquanto na Ásia, América do Norte e América do Sul foram encontrados um total de 3 casos, em cada país.

A média de idade dos pacientes era de $35,2 \pm 22,4$, e o diagnóstico dos casos ocorreu por meio de técnica sorológica, técnicas de imagens, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, que auxiliaram na detecção e localização das lesões causadas pela migração do parasito em estágio larval pelo tecido cerebral (Fan, 2020).

Dentre as técnicas utilizadas, a ressonância magnética apresentou sensibilidade em revelar granulomas em áreas corticais ou subcorticais do cérebro, mesmo assim, é desconhecido o impacto neuropsicológico da infecção por *Toxocara* em humanos, pois os mesmos eram assintomáticos, permanecendo muitos dos casos, não diagnosticados e subestimados (Fan, 2020).

Em uma análise de revisão de estudos temporal realizada por Chieffi (*et al*, 2021) no Brasil entre 2010 e 2020, foram encontradas prevalência de 6,4% (N=208) em

mulheres grávidas no Rio Grande do Sul, ocorrendo uma coinfeção, causada por *T. canis* e *Toxoplasma gondii*. Já doadores de sangue de Salvador/Bahia apresentaram prevalência de 46,3% (N=306), e em Brasília/Distrito Federal a prevalência foi de 7,4% (N=311). Nas análises realizadas, quanto a soropositividade de *T. canis*, houve maior prevalência na população rural do Rio Grande do Sul 71,8% (N=344), seguida por Salvador na Bahia 52,0% (N=338), Maringá no Paraná 51,6% (N=376), Pontal em São Paulo 14,4% (N=194) e Presidente Prudente em São Paulo 8,7% (N=253). Tais achados, demonstram as limitações desses estudos quanto a variação existente entre as cidades ou estados, e a necessidade de uma padronização experimental para entendermos melhor o cenário epidemiológico brasileiro.

1.2. *Toxocara canis*

Werner (1782) encontrou em cães o que descreveu como *Lumbricus canis*, verme que atualmente é conhecido como *T. canis*. O reconhecimento como *T. canis*, de acordo com Bowman (2020a), ocorreu por meio de publicações realizadas por Stiles e Hassal em 1905, Johnston em 1916, e por fim, Warren em 1970, que realizou a introdução do nome da espécie de maneira definitiva no meio científico (Webster, 1958; Bowman, 2020a).

T. canis é um nematódeo classificado como pertencente à ordem Ascaridida, família Ascarididae, superfamília Ascaridoidea, gênero *Toxocara* (Schoch *et al*, 2020). Sua forma adulta é encontrada no trato intestinal de cães, entre outros canídeos, apresenta importância veterinária em animais jovens, e importância socioeconômica como patógeno zoonótico de hospedeiros paratênicos (HP) e hospedeiros acidentais (HÁ) (Ma *et al*, 2017; Zyoud, 2017).

Seus vermes adultos são dioicos, com corpos cilíndricos, esbranquiçados, sem segmentos e com presença de revestimento de cutícula quitinosa. Os machos apresentam tamanho de 4 a 10 cm e cauda curvada, enquanto as fêmeas medem de 5 a 18 cm e possuem cauda reta. Com o uso da microscopia, é possível visualizar na região anterior asas cefálicas estreitas e semi-lanceoladas (Figura 5.1), além de três lábios bem definidos na vista facial da extremidade cefálica, com um lábio dorsal e dois lábios laterais (Figura 5.2). Na porção posterior do macho, há um pequeno processo digitiforme com espículos desiguais curvos e alados (Radwan, Khalil, El Mahi, 2009; Taylor, Coop, Wall, 2017).

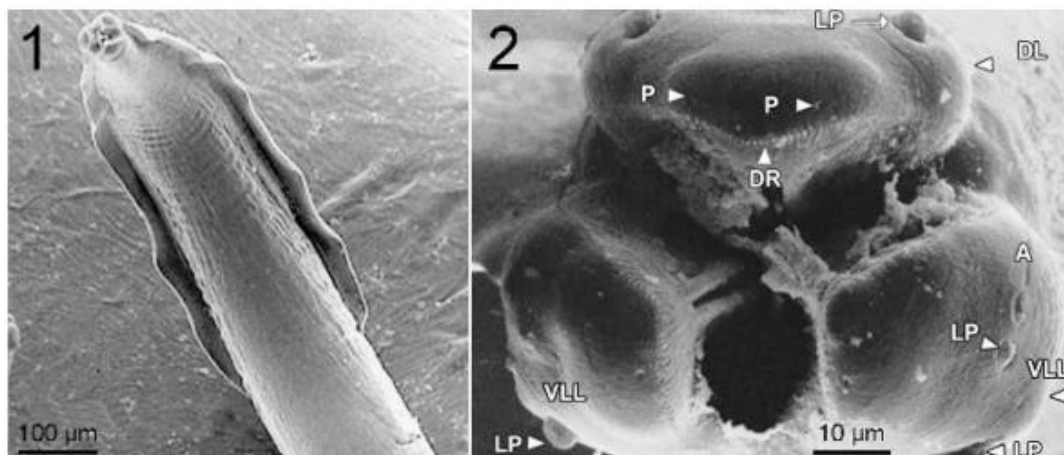


Figura 5: Micrografias eletrônicas de varredura de *Toxocara canis*. (1) - Região anterior com asas cefálicas estreitas e semi-lanceoladas. (2) - Presença dos três lábios na vista facial da extremidade cefálica é possível observar o um lábio dorsal (DL) e

Figura 2: Micrografias eletrônicas de varredura de *Toxocara canis*. (1) - Região anterior com asas cefálicas estreitas e semi-lanceoladas. (2) - Presença dos três lábios na vista facial da extremidade cefálica é possível observar o um lábio dorsal (DL) e dois lábios ventrolaterais (LP). Imagens em aumento de 100 µm e 10 µm (Retirada de Radwan, Khalil, El Mahi, 2009).

1.2.1. Ciclo biológico

O ciclo biológico de *T. canis* se dá por meio da liberação de ovos pela fêmea, sendo os mesmos ovoides a esféricos, e possuem quatro camadas de proteção. Em seu interior, o ovo possui uma massa citoplasmática que é protegida pela camada mais interna, a camada lipídica, que é seguida por duas camadas médias, sendo a de seu contato direto a camada quitinosa, e o contato direto a essa ocorre pela camada proteica, que possui contato direto com a camada mais externa, a camada rugosa. (Abou-El-Naga, 2018).

As camadas dos ovos servem tanto para proteção do conteúdo dentro do ovo, como para que, ele não sofra danos advindos do ambiente (Abou-El-Naga, 2018). Pois, ao chegarem no ambiente, os ovos necessitam de condições ideais para se desenvolverem e chegarem ao estágio larval. Sendo assim, é necessária uma temperatura entre 25 e 30°C, uma umidade relativa do ar de 85 a 95% para que os ovos cheguem ao estágio com larva infectante L3 (Epe, 2009; Schnieder, Laabs, Welz, 2011; Ma *et al*, 2017; CDC, 2020).

Logo, se estima que para se tornar infectante o ovo necessita de um período de 9 a 15 dias, em condições ambientais ideais, pois em condições adversas climáticas e de solo, pode ocorrer uma variação de 3 a 6 semanas, podendo até mesmo chegar a meses. Com isso, o ovo pode se manter viável com as larvas de terceiro estágio L3, por pelo menos 1 ano em boas condições ambientais (Epe, 2009; Schnieder, Laabs, Welz, 2011; Ma *et al*, 2017; CDC, 2020).

Tal afirmativa quanto a qual estágio do ovo é infectante apresenta controvérsias na literatura, pois alguns autores estipulam a ocorrência de duas mudas dentro do ovo no estágio larval, de maneira a se concluir que as larvas L2 são as infectantes, enquanto outros autores afirmam haver uma terceira muda, sendo as larvas L3 as responsáveis pela infecção (Bowman, 2020a).

Autores como Schacher (1957), Araujo (1972) e Bruñaská, Dubinský, Reiterová (1995), afirmam a ocorrência de perda de uma das bainhas do ovo, por conta da movimentação da larva, sendo esse o sinal de maturação do ovo e de que a larva L3 é a responsável pela infecção dos hospedeiros definitivo, paratênico e acidental (Bowman, 2020b).

Com o intuito de melhor analisar esse desenvolvimento dos ovos e entender as mudas larvais, Abou-El-Naga (2018) observou que os ovos (Figura 6) passam por: condensação da massa citoplasmática, formada apenas por uma célula (a); divisão celular, com formação de um espaço entre o embrião e a camada lipídica e presença de duas (b), três (c) e quatro (d) células; em seguida, o ovo passa por processos de divisão celular até a formação da mórula, que passa por dois processos, mórula precoce (e) e mórula tardia (f); após formação da mórula ocorre o processo de blastulação (g), gastrulação (h) e formação de uma pré larva (j) com dois subestádios, o primeiro com alongamento do embrião o deixando em formato de 'U'(j1) e o segundo com formação de um 'anel fechado'(j2); após o estágio pré - larval há formação das larvas de primeiro -L1 (k), segundo -L2 (l) e terceiro -L3 (m) estádios (Abou-El-Naga, 2018).

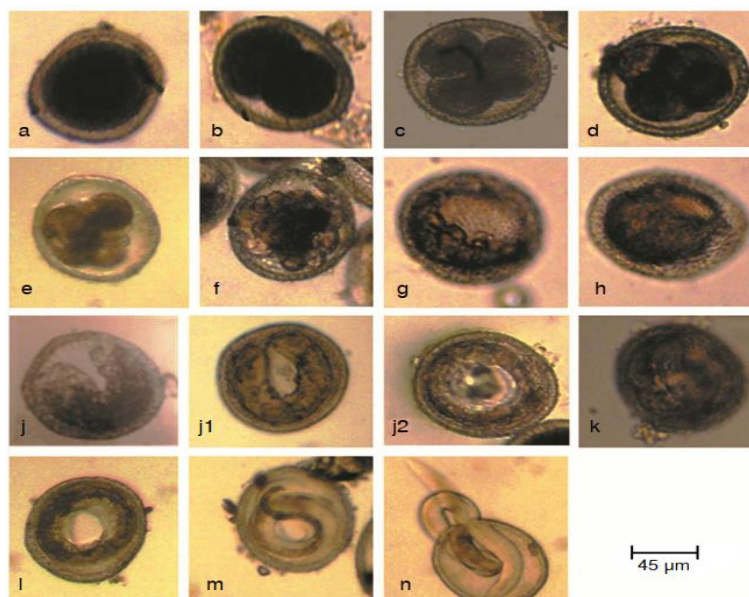


Figura 6: Estádios de desenvolvimento dos ovos de *Toxocara canis*. (a) única célula; (b) duas células; (c) três células; (d) quatro células; (e) mórula precoce; (f) mórula tardia; (g) blástula; (h) gástrula; (j) pré larva: (j1) embrião se torna longo permitindo que as extremidades em “U” se encontrem; (j2) embrião se torna um anel fechado; (k) larva de primeiro estágio – L1; (l) larva de segundo estágio – L2; (m) larva de terceiro estágio – L3; (n) larva emergindo naturalmente. Imagens em aumento de 45 μm (Fonte: Abou-El-Naga, 2018).

Essas observações quanto ao desenvolvimento do ovo levou o autor a relatar a formação das quatro camadas de proteção do ovo, ocorrendo com 12 e/ou 13 dias de cultura a presença de uma bainha cuticular em larvas L1. No dia 13, há presença de uma segunda bainha cuticular, definindo o autor esse fato como determinante de mudança do estágio larval fase de muda larval, sendo esse o momento de formação do estágio larval L2 (Abou El-Naga *et al*, 2018).

Após a formação da segunda bainha cuticular e muda da larval para L2, ocorre uma perda da primeira bainha cuticular a partir do dia 15 e/ou 16, ocorrendo em seguida a formação de uma terceira bainha cuticular no dia 19, observando-se no dia 20 de cultura a presença das duas bainhas no ovo que se diferenciam por conta de uma delas ser mais espessa e diferente da bainha observada 13º dia de desenvolvimento dos ovos. No 21º dia de cultura é observada a mudança de estágio larval, chegando-se à larva L3 (Abou El-Naga *et al*, 2018).

Logo, os achados do autor, quanto as diferenças morfológicas observadas no ovo e nas larvas, levam a conclusão de que as larvas sofrem três mudas dentro do ovo e de

que, a larva de estágio L3 é a responsável pela infecção dos hospedeiros, pois não foi observada alterações morfológicas após a sua formação (Abou El-Naga *et al*, 2018).

Com isso, após a infecção dos hospedeiros pelos ovos contendo larvas L3, alguns autores relatam alterações nas camadas lipídica e rugosa dos ovos ao chegarem no estômago, tal ocorrência se dá por conta da presença do pH ácido dentro desse ambiente, tornando então a camada externa do ovo mais frágil, e por consequência, auxiliando na eclosão da larva L3 em torno de 2 a 4 horas após a ingestão. Em seguida, as larvas L3 são direcionadas para o intestino, de onde, por meios mecânicos e pela ação de proteases, existentes nesse local, há penetração das mesmas na mucosa intestinal e chegada aos vasos linfáticos, realizando assim a migração para os nódulos linfáticos mesentéricos e adentrando nos capilares venosos, sendo levadas por meio da circulação porta, ao fígado após 24 horas de infecção (Akao, 2006; Akao, Ohta, 2007; Schnieder, Laabs, Welz, 2011; Alvarado-Esquivel *et al*, 2014; Strube, Heuer, Janecek, 2015; Abou-El-Naga, 2018; Bowman, 2020a).

No fígado, as larvas L3 realizam migração por meio da veia cava, passando pelo coração e chegando aos pulmões. Nos pulmões, por meio da artéria pulmonar as larvas podem seguir duas rotas diferentes, sendo ambas as rotas observadas no hospedeiro definitivo (Schnieder, Laabs, Welz, 2011).

A primeira rota, leva a penetração das larvas na parede dos alvéolos com continuidade da migração pelos bronquíolos, sendo transportadas para a traqueia e faringe, onde são deglutidas (Schnieder, Laabs, Welz, 2011). Essa rota remete a infecção patente no hospedeiro definitivo, sendo descrita por Schnieder, Laabs e Welz (2011) como a migração das larvas L3 dos bronquíolos ao estômago, local onde ocorre a muda da larva de terceiro estágio L3 para a larva de quarto estágio L4, que ao chegar no intestino delgado sofre nova muda para larva de quinto estágio L5, e se desenvolve para o estágio de verme adulto.

Destoando da representação de Schnieder, Laabs e Welz (2011), que afirma haver duas mudas antes do parasito se tornar verme adulto, Ma (*et al*, 2017) descreveu apenas uma muda de estágio, de L3 para L4, seguido com a mudança do parasito em verme adulto no intestino delgado. Essas apresentações divergentes, remeteram a discussão quanto a qual estágio larval dentro do ovo é possivelmente infectante, mas estudos anteriores realizados por Schacher (1957), Araujo (1972) e Bruñaská, Dubinský, Reiterová (1995) corroboraram que a infecção ocorre por ovos contendo larvas larva L3 e há duas mudas

de estádios, L4 e L5, antes da mudança de estágio para verme adulto (Bowman, 2020 a; Bowman, 2020b).

A mudança de estágio para verme adulto no intestino delgado acarreta a diferenciação do parasito em machos e fêmeas, para que assim ocorra a copulação e postura dos ovos larvados, que são depositados no ambiente junto com as fezes do hospedeiro. Após o período, aproximadamente, de 4 a 5 semanas, pós-infecção em cães filhotes, e de 6 a 8 semanas, pós-infecção em cães mais velhos (Schnieder, Laabs, Welz, 2011; CDC, 2020).

Já a segunda rota de migração do parasito ocorre em tecido somático, remetendo a infecção visceral. Nessa rota há migração da larva por todo o corpo do hospedeiro, e há uma predileção por alguns tecidos, onde a larva L3 se encapsula. Essa forma de expressão da infecção é denominada *larva migrans*, e as larvas L3 são encontradas principalmente nos pulmões, músculos esqueléticos, rins, fígado, coração e cérebro (Schnieder, Laabs, Welz, 2011).

A segunda rota de migração em tecido somático é observada em cadelas de maneira distinta, ocorrendo de forma estratégica para sobrevivência do parasito, se pensarmos em termos evolutivos (Schnieder, Laabs, Welz, 2011), pois nelas, as larvas L3 encapsuladas são ativadas, geralmente, no último trimestre de prenhes, havendo assim uma transmissão transplacentária para os filhotes no útero, e transmissão transmamária para os filhotes recém-nascidos. Essa ativação larval ocorre por conta das mudanças sofridas no sistema imunológico e na resposta hormonal por conta da prenhes da cadela (Schnieder, Laabs, Welz, 2011; Ma *et al*, 2017; CDC, 2020; Abou-El-Naga, 2018).

Já a transmissão das larvas L3 encapsuladas ao HD e/ou HP e/ou HA, ocorre quando esse se alimenta da carne crua ou malpassada do hospedeiro anterior, havendo reativação da larva L3, que invadem a parede intestinal sendo transportadas para a circulação sanguínea, chegando à vários tecidos, podendo seguir a rota de infecção patente no HD ou de infecção visceral nesse hospedeiro e nos outros, ocorrendo no HP um encapsular larval com larvas viáveis por 10 anos (Akao, 2006; Akao, Ohta, 2007; Alvarado-Esquivel *et al*, 2014; Strube, Heuer, Janecek, 2015).

Embora as larvas sofram com esse encapsular que acarreta na interrupção do desenvolvimento, processo denominado hipobiose, as larvas conseguem causar efeitos patogênicos nos hospedeiros que as ingere, como resposta inflamatória e formação de granulomas nos tecidos (Ma *et al*, 2017).

1.3. *Toxocara spp.* e seus hospedeiros

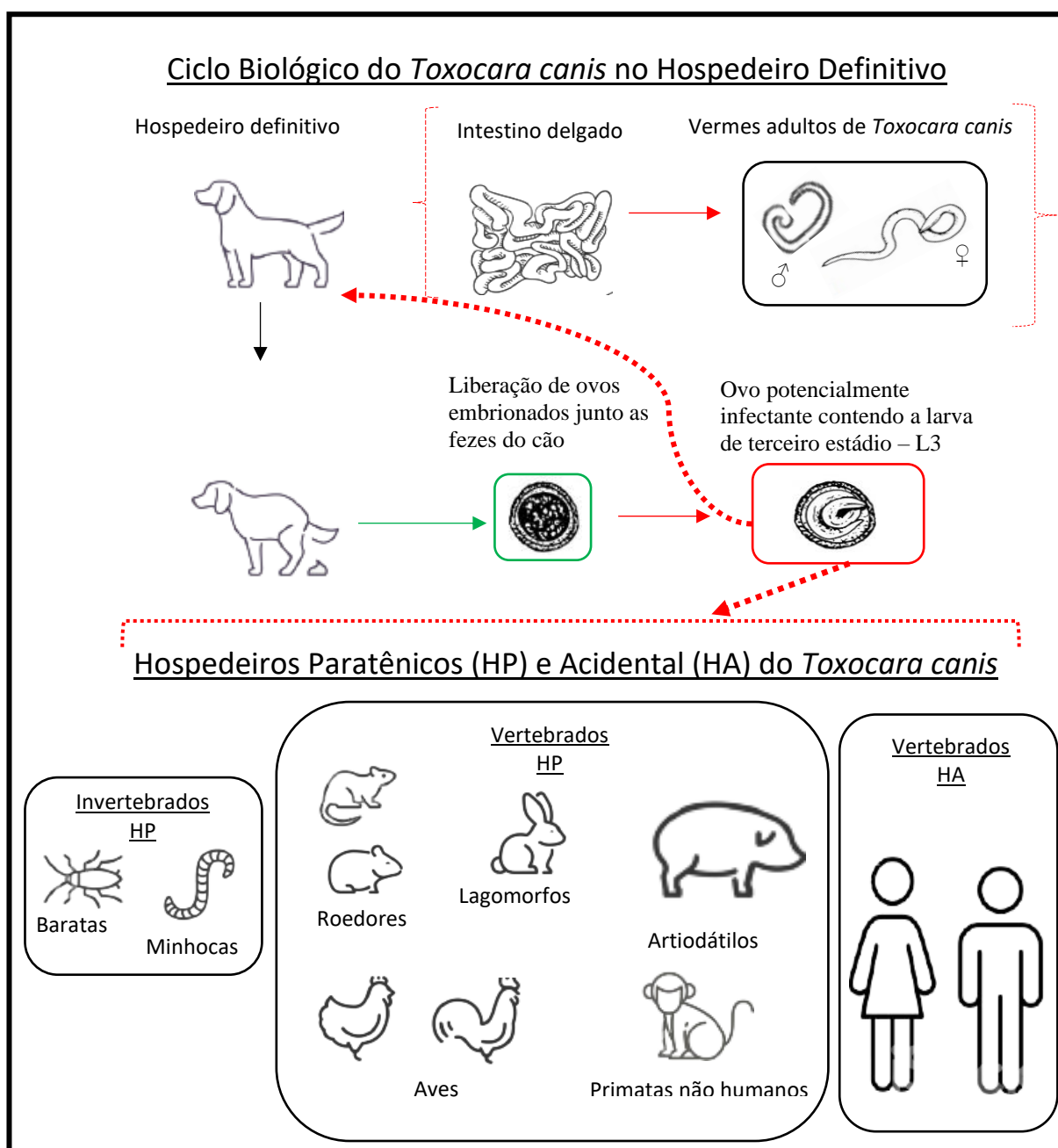
Nematoides do gênero *Toxocara* são parasitos zoonóticos cosmopolitas que utilizam de HD para contaminar o ambiente com seus ovos potencialmente infectantes, buscando dessa forma, dar continuidade ao seu ciclo biológico (Holland, 2015).

Esses HD podem ser canídeos selvagens ou domésticos, como cães, raposas e lobos, que albergam a espécie *T. canis*; felídeos como gatos, que albergam as espécies *Toxocara cati* e *Toxocara malaysiensis*; ou ruminantes, que apresentam infecção por *Toxocara vitulorum* (Ma *et al*, 2017).

A infecção desses HD acarreta a completude do ciclo parasitário do *Toxocara*, ocorrendo o desenvolvimento em vermes adultos, que realizam a copula e as fêmeas liberam os ovos que são carreados junto as fezes, e são potencialmente infectantes, podendo assim, levar a infecção dos denominados HP (Akao, 2006; Strube, Heuer, Janecek, 2015; Schnieder, Laabs, Welz, 2011).

Quando os HP são infectados pelos vermes de *Toxocara*, não há completude do ciclo biológico, visto que, o desenvolvimento parasitário para outros estádios larvais e estágio adulto com reprodução do parasito não ocorre. Mas, desses ovos ingeridos, os ovos larvados, apresentam eclosão das larvas que permanecem viáveis dentro do hospedeiro (Wu, Bowman, 2020; Bowman, 2020a).

Com isso, em análise de animais que albergavam o parasito *T. canis*, constatou-se que, invertebrados (Fluxograma 1) como minhocas e baratas, conseguem infectar todos os hospedeiros (Wu, Bowman, 2020), visto que, no caso da minhoca, foi observada presença de larvas L3 em todo seu sistema digestivo, enquanto nas baratas, foram encontrados ovos potencialmente infectantes e larvas L3 no sistema digestivo. Tal fato ocorre por conta de as baratas serem cosmopolitas que atuam como vetores mecânicos de diversos patógenos, e que liberam alguns deles, como no caso dos ovos e larvas L3 de *T. canis*, junto as fezes, tornando o ambiente contaminado (Wu, Bowman, 2020; Brusca, Moore, Shuster, 2018; Neves *et al*, 2016; Bowman, 2020a).



Fluxograma 1: Representação da transmissão do *Toxocara canis* ao hospedeiro definitivo, e transmissão parasitária aos hospedeiros paratênico e acidental. (Proporções dos desenhos não condizentes com a realidade. (Fonte: Elaborado pelo autor, 2021)

Já em HP de *T. canis* (Fluxograma 1), como os lagomorfos, foram observadas a presença de larvas L3 após 2 dias de infecção, enquanto nos artiodátilos, as larvas L3 estavam presentes no fígado após 24 horas de infecção. Na recuperação de larvas L3 em aves encontrou-se um número maior no fígado em todos os tempos dos experimentos realizados, enquanto répteis em tanques com temperaturas de 37°C apresentaram larvas

intra-hepáticas, mas quando a temperatura dos tanques permanecia entre 24 e 26°C, não houve migração parasitária para essa região. Já primatas, não humanos, podem manter as larvas L3 em seu organismo por um período de 9 a 10 anos (Wu, Bowman, 2020).

Além dos HP citados, na literatura o termo é também empregado para determinar a infecção por *Toxocara spp.* em humanos, visto que a migração larval segue o mesmo padrão observado nos HP e HD (Holland, Cox, 2001; Kolbeková *et al*, 2011a; Kolbeková *et al*, 2011b; Strube, Heuer, Janecek, 2015; Overgaauw, Van Knapen, 2013; Springer *et al*, 2019;). Mas, mesmo com esse padrão de infecção compartilhado alguns autores definem o hospedeiro humano como hospedeiro acidental (HA) (Hotez, Wilkins, 2009; Resende *et al*, 2015; Meliou *et al*, 2020;), termo melhor empregado para a infecção humana, visto que, seres humanos possuem estratégias de saúde única que incluem componentes de prevenção, diagnóstico e tratamento, aumentando assim, a base de conhecimento sobre a transmissão da parasitose, acarretando em um melhor controle da infecção (Ma *et al*, 2017).

Mesmo com todo esse conhecimento já desenvolvido em relação a toxocarose, fica claro que há aspectos desafiadores em relação a prevenção e a exposição ao parasito. Pois, mesmo havendo conhecimento do ciclo biológico do parasito, sabemos muito pouco em relação as rotas de transmissão, rotas de migração tecidual e danos causados pela larva nos HP e HA (Holland, 2015), pois o ciclo biológico do parasito apresenta muitos fatores biológicos que facilitam o sucesso e a perpetuação da toxocarose, incluindo vantagens na transmissão vertical e horizontal, que garantem a disseminação dos ovos potencialmente infectantes, de maneira a manter, a sobrevivência dos ovos no ambiente e a diversidade de HD e HP infectados (Macpherson, 2013).

Um dos fatores que auxiliam no sucesso do parasito é a aproximação com seus hospedeiros, chamando atenção para o fato de que, mais da metade da população global possui um ou mais animais de estimação, estimando-se que haja 470 milhões de cães e 370 milhões de gatos como animais de estimação no mundo (Jalongo, 2021). Tal ocorrência, principalmente em relação ao cão está relacionada aos benefícios que essa relação humano-cão pode fornecer, como melhoria ao bem-estar mental, apoio social, companheirismo, aumento de interações sociais humanas e diminuição de biomarcador do estresse, ou seja, diminuição dos níveis de cortisol e aumento da concentração de ocitocina, por exemplo (Powell *et al*, 2019).

1.3.1. Toxocarose em hospedeiro paratênico – ciclo biológico e aspectos fisiopatológicos em camundongos

A primeira observação da migração larval de *T. canis* em camundongos ocorreu em 1949 por Hoeppli, Feng e Li, que analisaram o movimento larval no fígado, formação de granulomas e a patologia causada nos animais (Hoeppli, Feng, Li, 1949).

A partir dessas observações sobre a migração somática das larvas de *T. canis* nos HP ocorreu a divisão do processo fisiopatológico em três fases (Figura2). Fase aguda (0 a 13 dias pós infecção), que equivale a fase hepato-pulmonar do HD, com penetração das larvas na parede intestinal e migração, por meio do sistema circulatório para fígado, pulmões e por fim, tecidos somáticos; fase subaguda (14 a 27 dias pós infecção) da infecção, onde há migração progressiva e acúmulo de larvas, que remetem a fase miotrópica-neurotrópica, havendo alterações comportamentais e ocorrência de reações inflamatórias no encéfalo de HP e HA; e fase crônica (28 dias pós infecção em diante), com retomada da migração larval (Strube, Heuer, Janecek, 2015; Strube *et al*, 2020).

A fase aguda em camundongos inicia com eclosão das larvas no estômago, estando essas no intestino delgado dentro de 2 horas pós-infecção. Com 3 horas pós-infecção, as larvas estão no cólon, havendo migração entre as vilosidades intestinais, através da base das criptas de Lieberkuhn, lâmina própria intestinal e túnica muscular. Larvas foram observadas nos vasos linfáticos, além de adentrarem na cavidade peritoneal com subsequente invasão do sistema vascular, veia porta hepática e veia hepática central (Abo-Shehada, Herbert, 1984).

A entrada na fase hepato-pulmonar, se inicia com a migração das larvas para o fígado, em um período de 24 horas após-infecção, apresentando o tecido inflamação linfocítica e neutrofílica ao redor do trato porta e dentro da região subcapsular (Bisseru, 1969; Resende *et al*, 2015). As larvas foram observadas nos pulmões dentro de 24 horas após-infecção, ocorrendo associação com danos teciduais como hemorragia, presença de agregados de linfócitos e neutrófilos com poucos eosinófilos (Bisseru, 1969; Kayes, Jones, Omholt, 1987; Resende *et al*, 2015). O pico larval, nos pulmões, foi observado no dia 3 após-infecção, havendo diminuição na quantidade de larvas encontradas, demonstrando assim a longevidade da infecção (Resende *et al*, 2015). E no mesmo tempo pós-infecção foi observada dispersão de larvas no encéfalo, refletindo o fim da fase aguda (hepato-pulmonar), e início da fase subaguda, miotrópica-neurotrópica (Abo-Shehada, Al-Zubaidy, Herbert, 1984; Resende *et al*, 2015).

As três fases de migração larval foram analisadas por Janecek e colaboradores (2017) em camundongos C57BL/6 infectados com 2.000 ovos. Nesse trabalho foi observado o comportamento dos animais por meio da aplicação de testes, concluindo-se que há alterações em parâmetros motores e neurológicos dos animais.

Já Springer e colaboradores (2019), ao analisarem as três fases de migração larval, observaram um neurotropismo das larvas L3 nos encéfalos de camundongos C57BL/6, que também apresentaram hemorragia, inflamação eosinofílica e processos neurodegenerativos no tecido. Além disso, as larvas L3 apresentaram preferência pela substância branca cerebral, possivelmente, por conta da vantagem nutricional oferecida pela mielina, e/ou por esse ser um caminho que apresenta menor resistência no cérebro. Essa preferência da larva acarretou danos na região do fórnix, que é composto por trato de fibras que ligam o lobo temporal medial, ao hipocampo e ao diencéfalo medial.

1.4. Aspectos clínicos e fisiopatológicos da toxocarose humana

O primeiro diagnóstico da toxocarose humana foi detectado na década de 50, encontrando-se larvas de *Toxocara* nos olhos de uma criança, sendo revelado o parasito, por meio de exame histológico, que apresentou as lesões granulomatosas no tecido (Wilder, 1950; Nichols, 1956). Desde então várias formas clínicas da toxocarose humana foram reconhecidas, como larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO), toxocarose encoberta ou comum (TC) e neurotoxocarose (NT), essas formas afetam os sistemas respiratório, hepático, muscular, sensorial e nervoso central (Deshayes, Bonhomme, Blanchardière, 2016; Ma *et al*, 2017; Janecek *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018).

A LMV, é a síndrome mais comum, sendo consequência da migração sistêmica das larvas L3 através de tecidos somáticos, que acarreta no hospedeiro acidental sintomas como dor abdominal, febre, hepatomegalia e tosse recorrente. Além disso, pode ocorrer manifestações cutâneas, cardíacas, associação com quadros asmáticos, reumatoide e suas complexidades, dentre outras manifestações (Chen *et al*, 2018; Auer, Walochnik, 2020).

Já a LMO, remete ao comprometimento da acuidade visual, estando tal fato relacionado com a localização da larva L3 nos olhos. Ocorre principalmente em crianças mais velhas e adultos, levando a invasão da larva na retina, a formação de granulomas que induz distorção da visão, dentre outros problemas (Auer, Walochnik, 2020).

A TC apresenta-se por meio de sintomas inespecíficos, como dor abdominal, febre, anorexia, náusea, dor de cabeça, vômito, faringite, pneumonia, tosse, letargia, sonolência, dor nos membros, erupção cutânea e disfunção pulmonar que dificultam o

diagnóstico (Deshayes, Bonhomme, Blanchardière, 2016; Ma *et al*, 2017; Janecek *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018). Além disso, ela pode apresentar sintomas como distúrbios de comportamento, levando o hospedeiro acidental a uma irritabilidade, mudanças de humor e distúrbios do sono (Deshayes, Bonhomme, Blanchardière, 2016; Ma *et al*, 2017; Janecek *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018; Auer, Walochnik, 2020).

A NT é provocada pela invasão das larvas ao sistema nervoso central, havendo preferência das larvas L3 pela substância branca cerebral e cerebelar, com oclusão dos vasos arteriais cerebrais, acarretando problemas neurológicos, motores, distúrbios neuropsicológicos e doenças neurodegenerativas. (Deshayes, Bonhomme, Blanchardière, 2016; Ma *et al*, 2017; Janecek *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018). Essas lesões causadas pelas larvas L3 na NT podem estar relacionadas a desordens neurológicas e psiquiátricas como quadros epiléticos, prejuízos no desenvolvimento cognitivo, progressão de doenças neurodegenerativas como esclerose múltipla, Parkinson e Alzheimer, deficiências motoras, distúrbios neuropsicológicos como demência, depressão, ansiedade e esquizofrenia. Além disso, podem induzir no hospedeiro acidental meningite, encefalite, vasculite cerebral ou mielite, febre inconstante, podendo abranger sintomas que levam a um diagnóstico e tratamento errôneo do paciente (Ma *et al*, 2017; Janecek *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018; Fan, 2020; Gale, Hedges, 2020).

1.5. Resposta imunológica na toxocarose

Helmintos intestinais induzem a ativação da imunidade tipo 2 (Th2), que é caracterizada pela produção de interleucinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. A ligação entre IL-4 e IL-13, por meio do receptor alfa da cadeia de IL-4, junto a superfície de células imunes e não imunes ativa mecanismos efetores, que levam a expulsão do parasito. Além disso, helmintos modulam a resposta imune do hospedeiro e a capacidade de indução das células T reguladoras (Tregs), assim a resposta imune Th2, que se inicia no intestino, aparece como um marcador da cronicidade da infecção, pois respostas crônicas podem estar relacionadas ao início da resposta do tipo 1 (Th1), mesmo a resposta imune Th1 não possuindo o papel de proteção no hospedeiro (Cortés *et al*, 2017).

Já na infecção por *T. canis*, a sobrevivência e ação patogênica das larvas apresenta associação aos produtos excretores-secretores (TES), que ativam e modulam o sistema imunológico do hospedeiro, permitindo assim a sobrevivência da larva nos tecidos por meses, ou até mesmo anos (Ruiz-Manzano *et al*, 2019).

A resposta imune durante a infecção crônica da toxocarose em HP é caracterizada por eosinofilia no sangue periférico, infiltrado eosinofílico nos tecidos de migração larval e produção de antígenos específicos como imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina E (IgE). Além disso, há resposta imune celular sistêmica com participação de células T auxiliaadoras do tipo 2 (Th2) (Ruiz-Manzano *et al*, 2019).

Os antígenos excretados e secretados do parasita (TES) estimulam a produção de citocinas do tipo Th2, como a IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, com aumento de eosinófilos e aumento dos anticorpos IgE e IgG (Leal-Silva *et al*, 2021).

Em estudo realizado por Ruiz-Manzano (*et al*, 2019), com soros de seres humanos, positivos para anticorpos específicos de *T. canis*, foram detectados níveis elevados das citocinas IL-4 e IL-10, enquanto em camundongos infectados experimentalmente, foram encontrados níveis de IL-5 e IL-4 aumentados nos dias 7 e 14 após-infecção. A produção de IL-4 e IL-5 também foi induzida em ensaios *in vitro* com sangue humano, estimulando células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com antígeno TES. Assim, a indução de uma resposta imune predominantemente do tipo Th2 foi demonstrada como a principal resposta imune durante o processo da infecção por *T. canis* (Ruiz-Manzano *et al*, 2019).

Resende (*et al*, 2015) na avaliação da fase aguda da infecção, em camundongos fêmeas BALB/c inoculados com 1.000 ovos larvados, encontrou resposta inflamatória inata, Th2 e Th17 com aumento significativo e gradativo até o 7º dia da infecção de IL-5 e IL-6, com pico no 3º de infecção. Com níveis de IL-4, IL-13 e IL-17 com aumento significativo na fase subaguda da infecção, e sem diferenças nas produções de TNF- α e IFN- γ .

1.6. Diagnóstico e Tratamento da toxocarose

A toxocarose se apresenta clinicamente com sintomas inespecíficos, que podem acarretar morbidade prolongada e desenvolvimento de complicações. Logo, o diagnóstico da toxocarose em HP e/ou HA é dependente de evidências clínicas, exames histopatológicos, exames de imagem como radiografias, ressonância magnética, avaliação morfométrica de larvas presentes, e detecção de DNA larval por meio de tecido e/ou fluido corporal (Strube, Heuer, Janecek, 2015; Ma *et al*, 2017; Chen *et al*, 2018).

Dentro das evidências clínicas necessárias para diagnosticar a toxocarose devemos considerar que algumas formas de análises, como as que necessitam de amostra tecidual e/ou fluídos corporais, que não seja o sangue, podem ser impraticáveis, por serem

métodos de coleta invasivos. Com isso, em humanos, o diagnóstico da toxocarose ocorre por meio da coleta de sangue periférico e uso de técnicas sorológicas e imunológicas, além disso, pode ocorrer a combinação de métodos, com acréscimo dos exames de imagem (Ma *et al*, 2017).

Com isso, o sorodiagnóstico realizado por ensaios de ELISA indireto, é o teste padrão utilizado para detectar anticorpos específicos contra os antígenos TES de *T. canis*, apresentando boa sensibilidade e especificidade. Mas, precauções devem ser tomadas quanto ao uso do método visto que, há reação cruzada com antígenos de outros helmintos intestinais, como por exemplo *Ascaris sp.*, levando o teste a apresentar resultados falsos-positivos para *Toxocara* (Chen *et al*, 2018; Fialho, Correa, Lescano, 2020).

Buscando evitar resultados falsos-positivos devemos considerar a sensibilidade e especificidade dos ensaios imunológicos, pois o diagnóstico da toxocarose depende do tipo de antígeno utilizado, se é produto bruto da larva de *T. canis*, TES nativo, TES recombinante, TES desglicosilado, ou antígeno de glicano, além disso, o tipo de anticorpo medido, se IgG total, subclasse de IgG ou IgM (Chen *et al*, 2018).

Ao se ter esses cuidados e com o fechamento do diagnóstico, deve-se ter atenção para entender em qual fase da infecção o hospedeiro acidental se encontra, pois isso é o diferencial para se realizar o tratamento adequado do anti-helmíntico, visto que na fase agudada da infecção há busca para prevenir a migração larval para o sistema nervoso central e os olhos (Fialho, Correa, Lescano, 2020).

Para o tratamento na fase aguda é indicado o uso de anti-helmínticos como o albendazol e o mebendazol, pois esses apresentam, o primeiro, uma rápida distribuição nos tecidos após ser metabolizado, além de atravessar a barreira hematoencefálica auxiliando melhor no tratamento da NT, e o segundo uma não absorção fora do trato gastrointestinal. Mas para o tratamento com ambos se recomenda uso contínuo do medicamento no período de 3 a 4 semanas (Fialho, Correa, Lescano, 2020).

Concomitante ao uso do anti-helmíntico, dependendo do prognóstico do caso, é recomendado utilizar anti-inflamatórios, como corticosteroides ou anti-inflamatórios não esteroides, com o intuito de evitar complicações inflamatórias, como ocorre na LMO, em que casos graves acarretam em problema vítreo e deslocamento da retina, requerendo até mesmo processo cirúrgico (Fialho, Correa, Lescano, 2020).

1.7. Psicobiologia

Os primeiros estudiosos das relações entre cérebro e comportamento foram os filósofos, que contribuíram para o surgimento da biologia e da psicologia, que durante o século XX formou, o que alguns se referem como, psicobiologia, biopsicologia ou neurociência (Pinel, Barnes 2018; Breedlove, Watson 2017).

A psicobiologia, realiza o estudo de processos dinâmicos em organismos inteiros, integrados, adaptados e organizados, em busca de ampliar o conhecimento dos processos complexos e dinâmicos (Dewsbury, 1991) por meio de três abordagens, que auxiliam no entendimento da relação entre cérebro e comportamento (Breedlove, Watson 2017).

As três abordagens utilizadas pela psicobiologia são, (1) intervenção somática, que remete a alterações na estrutura e/ou função cerebral, para se compreender alterações comportamentais, sendo a intervenção somática uma variável independente e o efeito comportamental a variável dependente, sendo o resultado dependente da alteração; (2) intervenção psicológica ou comportamental, em que há intervenção comportamental e/ou análise experiencial do organismo em busca de mudanças estruturais ou de função, sendo então o comportamento a variável independente e as mudanças a variável dependente; e (3) correlação, a qual se busca determinar variações entre aspectos fisiológicos e comportamentais (Breedlove, Watson 2017).

Essas três abordagens utilizadas pela psicobiologia são perceptíveis na manipulação do comportamento animal realizada por parasitas, pois a busca por manipular o comportamento do hospedeiro o leva a ser transmitido. Com isso, temos três formas que são aplicadas as parasitoses transmitidas ao humano ou zoonóticas, sendo essas formas (1) transmissão trófica, em que há alteração do comportamento ou da aparência do hospedeiro intermediário no intuito de aumentar a probabilidade de sua transmissão para o hospedeiro definitivo; (2) transmissão horizontal direta em que o comportamento do hospedeiro o leva a ter mais contato com a sua espécie, favorecendo a transmissão; e por fim, (3) emergência do hospedeiro em micro-habitat distinto onde o hospedeiro passa a estar em um ambiente diferente do seu, permitindo sua transmissão hospedeiro (Godfrey e Poulin, 2022).

1.7.1. Psicobiologia parasitária

Dentro desse cenário de entendimento da psicobiologia parasitária, e principalmente de transmissão zoonótica, temos como o parasita mais famoso, em relação a manipulação do hospedeiro, o apicomplexa *Toxoplasma gondii*. Esse parasita realiza

manipulação do hospedeiro intermediário, roedor, para que o mesmo se atraia pela urina de felinos, que são os hospedeiros definitivos desse parasito. Nesse cenário o hospedeiro definitivo muitas vezes escolhido é o gato doméstico, que deve preda o roedor e ingerir o tecido contendo cistos do parasita, para que o ciclo do mesmo se complete e a transmissão da espécie seja continuada (Godfrey e Poulin, 2022).

Mas, para que haja a predação do hospedeiro roedor, o parasita, realiza alterações do comportamento do hospedeiro animal, como aumento da exploração e perda do medo de ser predado. Já no hospedeiro humano foi percebida alterações como, aumento da impulsividade e quebra de regras e modificações nos traços de personalidade (Godfrey e Poulin, 2022).

Essas alterações no roedor foram constatadas por Castaño-Barrios e colaboradores (2021), que inocularam em camundongos C57BL/6 fêmeas adultas cistos de *T. gondii* da cepa ME-49 tipo II. Os animais foram analisados a partir do 30º dia após a inoculação em relação a seus comportamentos, por meio do teste de campo aberto, teste de suspensão da cauda e teste do nado forçado. Os resultados obtidos demonstraram nos animais a presença de comportamentos tipos ansiogênico, depressivos e hiperatividade, sendo esses detectados desde o 30º dia após a infecção até o 90º dia após infecção (Castaño-Barrios, *et al.* 2021).

Além do *Toxoplasma gondii*, outro protozoário em que os hospedeiros roedores foram analisados quanto a psicobiologia foi o *Trypanosoma cruzi*, em específico cepa colombiana (tipo I) e γ (tipo II) em camundongos C3H/He e C57BL/6, que foram submetidos aos testes de nado forçado e suspensão pela cauda. Nesses animais foram encontrados comportamento tipo depressivo crônico, causado pela cepa colombiana (tipo I), sendo a depressão independente da inflamação ativa ou prévia do sistema nervoso central (Vilar-Pereira, *et al.* 2012).

Outro parasita presente na literatura em relação a psicobiologia é o helminto *Angiostrongylus cantonensis*, sendo suas larvas inoculadas em BALB/c e C57BL/6, e os animais foram submetidos ao teste de nado forçado, teste do campo aberto e o teste do labirinto aquático de Morris. Nesses animais foram encontrados prejuízos da aprendizagem espacial e memória, além de comportamento tipo depressivo nos camundongos BALB/c e comportamento tipo ansiogênico em animais C57BL/6 (Jhan, *et al.* 2020).

1.7.2. Psicobiologia na toxocarose

A migração larval realizada por *T. canis* no encéfalo não induz uma síndrome neurológica reconhecível, mas estudos reconhecem um efeito sutil sobre a cognição humana, como baixo rendimento escolar de alunos soropositivos em comparação com alunos soronegativos (Fan, 2020).

Em um estudo de meta análise, quanto aos efeitos da NT no HA, foram encontradas 100 publicações de relato de caso, encontrando-se efeitos como encefalite em 47% das publicações analisadas, déficits focais em 33%, confusão mental em 23%, convulsões 14% e distúrbios cognitivos em 11% das publicações. Tais achados corroboraram com a afirmação de que deficiências em funções cognitivas não acarretam diretamente em distúrbios cognitivos óbvios, como demências e doença de Alzheimer por exemplo, mas podem levar a sub-diagnosticos quando há avaliação, por meio de testes de espectro neurocognitivo e psicológico (Gale, Hedges, 2020). Outros estudos relataram sintomas como dores de cabeça, febre, sintomas depressivos e até mesmo esquizofrenia relacionada a infecção por *Toxocara* (Axelerad *et al*, 2021).

Logo, o que temos dentro do atual cenário quanto a toxocarose humana, é uma escassez de estudos que demonstrem evidências quanto ao papel do *Toxocara* nos processos cognitivos humanos. Assim, o camundongo se torna modelo útil para estudos de correlação e entendimento do processo infeccioso humano (Fan, 2020).

Como vemos no estudo de Cox e Holland (2001a), no qual, a quantidade de ovos inoculados de *T. canis* foi o padrão de comparação para a análise psicobiológica. Logo, o comportamento de exploração apresentou-se prejudicado no grupo de infecção com 3.000 ovos, levando a hipótese de que, essa mudança poderia resultar em maior vulnerabilidade do hospedeiro à predação, assim como a diminuição da ansiedade em espaços abertos. Além disso, os animais com inóculos de 3.000 e 1.000 ovos apresentaram um gasto maior de tempo para encontrar água, após privação de 24 horas, levando a hipótese de que haveria um déficit de memória.

Um estudo utilizando cepas distintas de camundongos, concluiu que a infecção por *T. canis* acarretou em um comprometimento da memória em animais consanguíneos e infectados com 2.000 ovos. Na tarefa de encontrar água, camundongos BALB/c demoraram mais para beber água, após o início da exploração em comparação a outros camundongos. Quanto a imobilidade, se constatou que eles não apresentavam letargia. Logo, se concluiu que camundongos infectados por *T. canis*, apresentam redução das

habilidades exploratórias, trazendo implicações para sua sobrevivência (Hamilton *et al*, 2006).

A correlação entre ansiedade, exploração e aprendizagem de camundongo infectados por *T. canis*, foi explorada em estudo com três níveis distintos de inoculo, com 100, 1.000 e 3.000 ovos embrionados. No experimento do labirinto em T houve menor exploração pelos camundongos infectados, havendo menor nível de exploração quanto maior o número de ovos inoculados. Já no labirinto em cruz elevado, os camundongos se apresentaram com níveis reduzidos de ansiedade em relação a áreas aversivas, principalmente nos animais inoculados com 1.000 e 3.000 ovos. E mais uma vez na tarefa de encontrar a água, percebeu-se prejuízo na capacidade de aprendizagem (Cox, Holland, 2001b).

Assim, o que se percebe nesses estudos é que animais com doses menores de infecção no cérebro demonstram um maior nível de comportamento de risco, gastando maior tempo em locais com odor do predador e com claridade. Logo, os estudos concluem que o comportamento é influenciado pelo número de larvas de *T. canis* acumulados no cérebro (Cox, Holland, 1998).

Assim, a manipulação parasitária do comportamento do hospedeiro ocorre de maneira complexa e multifacetada. Tal manipulação evoluiu juntamente com as manipulações fisiológicas necessárias para sobrevivência do parasito no organismo (Adamo, 2013).

1.8. Prevenção a infecção por *Toxocara canis*

Ao pensarmos na prevenção a infecção por *T. canis* devemos considerar os três impulsionadores da toxocarose humana e animal, citados por Hotez (2020), sendo eles a pobreza, o aquecimento global e a urbanização. Além desses impulsionadores devemos considerar estudos, que demonstram colocar a toxocarose, no mesmo nível de outras zoonoses que apresentam transmissão pelo solo. Além disso, devemos considerar as limitações quanto a sua prevenção, tratamento e vigilância sanitária, principalmente em relação a áreas públicas de recreação como parques, praças e playgrounds, onde é recorrente a presença de cães e gatos (Hotez, 2020; Papavasiliopoulos *et al*, 2018; Ma *et al*, 2017).

Ao considerarmos tais fatores, sabemos que a transmissão e o risco variam em diferentes partes do mundo, mas a pobreza, a falta de educação, os problemas de controle populacional e não tratamento de HD, acarretam em contaminação do ambiente pelas

fezes dos animais, ocorrendo favorecimento na transmissão de patógenos em associação a falta de higiene e o ato de geofagia ou pica (Macpherson, 2013).

Assim, o ambiente físico desempenha papel crucial na manutenção e distribuição dos ovos possivelmente infectantes de *T. canis*, pois, os ovos podem durar de meses a anos no ambiente, por conta de sua camada externa protetora, que permite ao ovo resistir a vários produtos químicos agressivos, temperaturas extremas e graus de umidade (Despommier, 2003).

Com isso, recomenda-se como prevenção a desparasitação de animais domésticos de maneira frequente e desde tenra idade, com atenção para filhotes e cadelas prenhas, já que possuem maiores chances de transmitirem o patógeno (Chen *et al*, 2018). Além disso, a coleta e devido descarte das fezes desses animais domésticos, junto a higienização das mãos, principalmente após tocar ou brincar com animais e/ou após exposição a locais com potencial de contaminação. Devendo-se manter animais infectados longe de locais de lazer ao ar livre, ensinando crianças a não levarem utensílios possivelmente contaminados a boca e não realizarem o ato de geofagia, realizando devida higienização de hortaliças frescas e observar as fontes de água quanto a algum contaminante ambiental (Akao, 2006; Alvaro-Esquivel *et al*, 2014; Chen, *et al*, 2018).

2. Justificativa

D

Durante a evolução e a interação entre, parasito e hospedeiro, foram descritos alguns mecanismos para iludir, inibir e subverter os mecanismos de defesa do hospedeiro, levando o parasito, a uma interação com o sistema nervoso central (SNC), que acarretou mudanças de comportamento, que podem aumentar a transmissão do parasito. Tais alterações nos levam a estudar a interação parasito-hospedeiro, como maneira de entendermos a manipulação do comportamento, por meio, da psicobiologia (Adamo, 2013).

Logo, para entendermos a interação parasito-hospedeiro causada em humanos em níveis fisiopatológicos, utilizamos modelos experimentais como roedores (camundongos, gerbis e ratos) de maneira ampla (Guimarães, *et al.*, 2015; Pecinali, *et al.*, 2005; Ruiz-Mazano *et al.*, 2019).

O uso de roedores, em específico camundongos de diferentes linhagens, no caso da toxocarose têm sido recorrentes para entendermos a via de migração larval, a resposta imune do hospedeiro, os mecanismos de defesa do organismo e os efeitos patológicos causados pela migração e encapsulamento larval nos tecidos (Camparoto, *et al.*, 2008; Lescano, *et al.*, 2012).

Dentre os roedores para uso experimental na infecção por *T. canis*, o camundongo é o escolhido por apresentar semelhanças fitopatológicas com a toxocarose humana, principalmente em relação ao sistema imunológico, que orchestra um equilíbrio cuidadoso entre a resposta pró-inflamatória, anti-inflamatória e reguladora. Esse equilíbrio e processo inflamatório ocorre de maneira não tão eficiente, visto que, há sobrevivência de larvas L3 em HP e HA, indicando assim o não sucesso do sistema imune na eliminação do parasito (Resende *et al.*, 2015; Holland, 2015).

Com o conhecimento sobre a sobrevivência da larva nos hospedeiros, devemos considerar as vantagens em cima do modelo experimental no estudo da toxocarose. A primeira vantagem, está relacionada com a existência da infecção de forma natural em camundongos selvagens, a segunda remete ao acúmulo de larvas ao longo do tempo em tecido somático, e como terceira vantagem camundongos com origens genéticas diferentes, ou seja, consanguíneos ou não consanguíneos, diferem na capacidade de albergar larvas no encéfalo, levando a pensar na influência genética e da resposta imune do hospedeiro para o sucesso da infecção (Fan, 2020).

Logo, ao compararmos os estudos com distintas cepas e linhagens de camundongos, como BALB/c, C57BL/6, C3H/He DBA/2, NC e BALB/c camundongo *nude*, encontramos um maior percentual de recuperação larval em camundongos BALB/c (Wu, Bowman, 2020).

Animais BALB/c inoculados com 1.000 ovos, ou mais ovos larvados, apresentaram no estudo de Strube e colaboradores (2020) uma recuperação nos encéfalos de 9,5% a 18,6% das larvas L3 inoculadas. Mas, ao buscarmos semelhanças com a NT humana encontramos em comparação com a cepa C57BL/6 utilizada no estudo de Springer e colaboradores (2019), presença de hemorragias, inflamação eosinofílica e processos neurodegenerativos, que são achados também na doença em humanos. A semelhança de sintomas clínicos, alterações neurológicas e a susceptibilidade a infecção no camundongo o leva a ser um modelo de hospedeiro adequado em comparação a NT humana (Janecek *et al*, 2017).

Nesse contexto, a relevância deste estudo se faz quanto a representação do camundongo como modelo para análise do impacto do *T. canis* na biologia e comportamento do hospedeiro, fornecendo assim, possíveis percepções que podem elucidar a toxocarose em roedores e hospedeiro humano. Com isso, o processo infeccioso e patológico desencadeado por *T. canis* em camundongos BALB/c, infectados com diferentes cargas parasitárias foi investigado, analisando-se a infectividade das larvas L3 na fase subaguda e crônica, por meio da recuperação larval e análise histopatológica do tecido pulmonar, hepático e encefálico, buscando-se identificar alterações patológicas. Além disso, análises sobre o impacto direto das larvas L3 no sistema nervoso central foram realizadas por meio de testes psicocomportamentais. A detecção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias serviram como marcadores secundários da infecção e trouxeram parâmetros quanto a inflamação causada no hospedeiro perante a parasitose.

Com isso, embasamos sobre a hipótese de que a infecção por *T. canis* no hospedeiro paratênico BALB/c leva a alterações histopatológicas e inicia processos inflamatórios, que podem acarretar mudanças psicocomportamentais, equiparadas a processos depressivos e ansiosos, que estão correlacionados com a quantidade de ovos larvados inoculados. Logo, o impacto da infecção estudado nesse trabalho pode auxiliar na explicação e discussão quanto ao sucesso do parasito em HP e HA e a sua propagação para outros hospedeiros.

3. Objetivo Geral

Avaliar os impactos da infecção por *T. canis* com inóculos de 100 e 1.000 ovos larvados durante a fase subaguda e crônica em modelo murino BALB/c, considerando parâmetros parasitológicos, psicobiológicos, imunopatológicos e histopatológicos da infecção.

3.1. Objetivos Específicos

- Identificar larvas L3 de *T. canis* em tecido pulmonar, hepático e encefálico na fase subaguda e crônica da infecção, no modelo murino BALB/c
- Analisar o estado fisiológico dos animais infectados por *T. canis* nas fases aguda, subaguda e crônica, por meio do peso corporal dos animais.
- Identificar o impacto psicobiológico da infecção por *T. canis* nas fases aguda, subaguda e crônica, por meio de instrumentos da análise do comportamento, teste de Neofagia e teste do Nado Forçado.
- Dosar níveis séricos das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como marcadores de infecção, nas fases subaguda e crônica da infecção por *T. canis*.
- Identificar alterações patológicas de maneira a descrever aspectos histológicos em tecido pulmonar, hepático e encefálico.

4. Materiais e Métodos

Para execução do projeto e análise dos objetivos específicos foram utilizados materiais e métodos que apresentaram protocolos publicados em periódicos científicos, com isso, os materiais e métodos foram descritos em acordo com os objetivos específicos e as hipóteses de trabalho testadas. Logo, toda a pesquisa foi conduzida em acordo com protocolo submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Protocolo CEUA 38/2020.

A elaboração dessa dissertação foi embasada nas normalizações da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT publicadas em 2002 (NBR 10520), 2003 (NBR 6028), 2011 (NBR 14724), 2012 (NBR 6024, NBR 6027) e 2020 (NBR 6023), como forma de padronização da escrita científica e apresentação dos resultados obtidos.

4.1. Aspectos Éticos da Pesquisa e Material Biológico

Para os experimentos utilizamos camundongos fêmeas da Linhagem Isogênica de Camundongos de Pelagem Albina – BALB/c com idade entre 7 e 8 semanas.

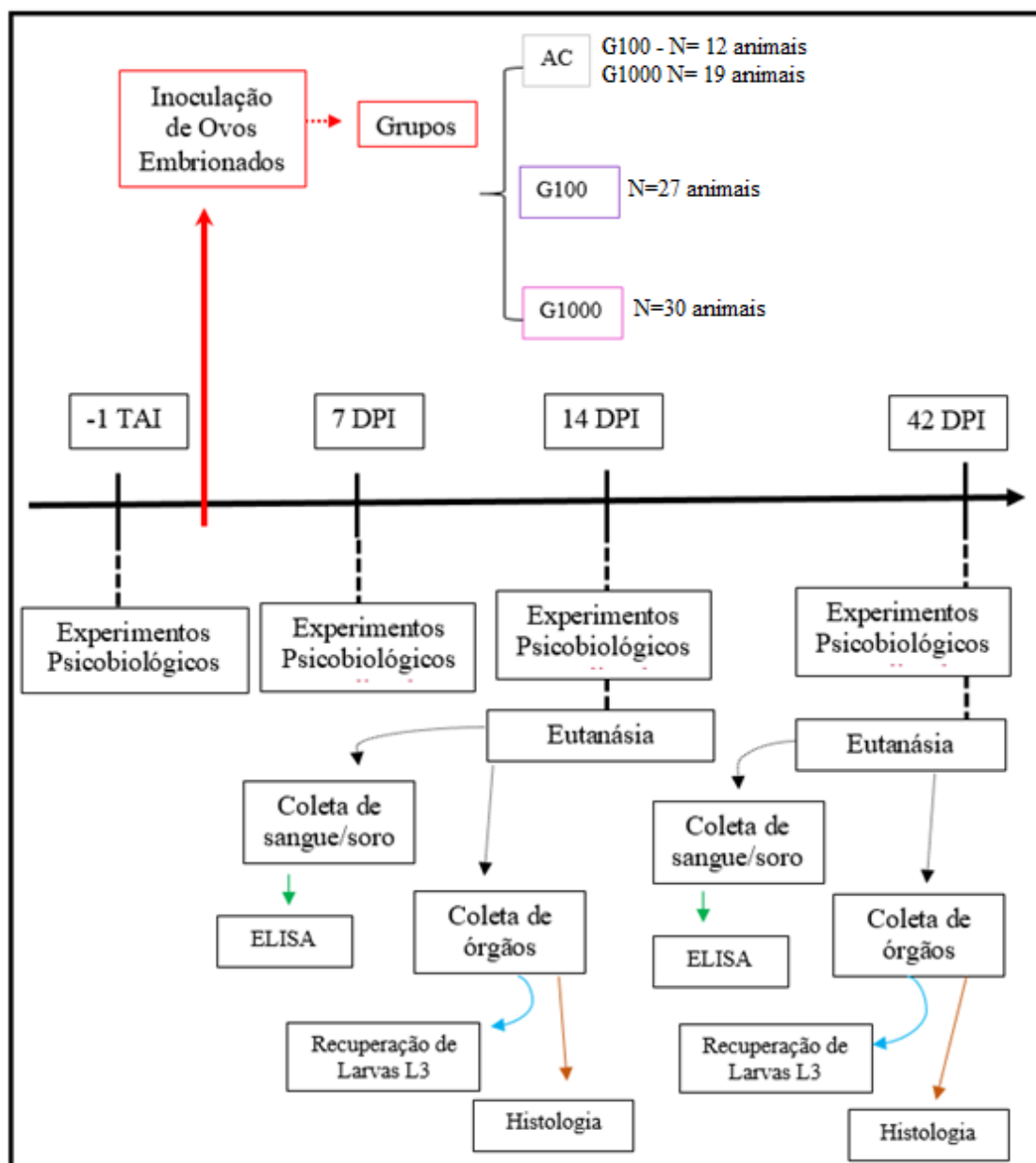
Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFMG e mantidos no biotério de manutenção da professora Dra. Déborah Negrão Corrêa no Departamento de Parasitologia, em condições ambientais de temperatura em torno de 25°C e com manutenção do ciclo circadiano por meio de timer automático, mantendo ciclo claro/escuro de 12 horas.

Os animais foram recebidos com 5 e 6 semanas, logo foram identificados e acondicionados em gaiolas coletivas, com no máximo 7 animais por gaiola com alimento e água *ad libitum*. Durante o período de 2 duas semanas corridas, a partir da entrada no biotério, os animais passaram por adaptação ao ambiente e ao manuseio constante, para então, com a idade de 7 e 8 semanas, darmos início aos experimentos.

4.2. Desenho Experimental – Aspectos Gerais

Os experimentos se iniciaram após o período de ambientação dos animais, com os animais na idade de 7 e 8 semanas.

O fluxograma 2 demonstra o delineamento experimental, que iniciou no momento -1 TAI (Tempo antes da infecção), com a análise psicobiológica do comportamento. Em seguida, houve nova identificação dos animais com divisão em acordo com a carga de ovos larvados a ser inoculada.



Fluxograma 2: Delineamento experimental.

Com isso, os animais foram divididos em grupo G100, com N total de 27 animais submetidos a inoculação, por método de gavagem, com 100 ovos larvados de *T. canis*; em grupo G1000, com N total de 30 animais inoculados, por método de gavagem, com 1.000 ovos larvados de *T. canis*; e grupo AC, grupo de animais controle que não receberam inoculo de ovos larvados de *T. canis*. O grupo AC foi dividido em dois, com N total de 12 animais para o grupo G100, 6 animais por fase de infecção, e o grupo G1000

com N total de 19, com 9 animais na fase subaguda da infecção 14DPI e 10 na fase crônica da infecção 42 DPI.

Após a inoculação dos ovos larvados de *T. canis* os animais foram testados quanto aos aspectos psicobiológicos de seus comportamentos nos dias 7 DPI (7º dia após a inoculação dos ovos larvados), 14 DPI (14º dia após a inoculação dos ovos larvados) e 42 DPI (42º dia após a inoculação dos ovos larvados).

Nos tempos de análise da infecção 14 DPI e 42 DPI os animais foram anestesiados, por meio de anestesia geral realizada com injeção intraperitoneal com agulha de 22 cm contendo anestésico composto por quetamina 80 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg. Em seguida, com os animais sob o efeito do anestésico, ocorreu o ensanguinhamento pelo globo ocular, coletando-se sangue para testes dos níveis de citocinas e quimiocinas por método de ELISA.

Após a exsanguinação, os animais foram decapitados para retirada dos encéfalos, separando-se cérebro e cerebelo, que foram de maneira randomizada encaminhados para recuperação de larvas L3 de *T. canis* ou, os encéfalos inteiros foram armazenados em formalina tamponado 10% para posterior análise histopatológico, sendo a metodologia empregada em cada método discutida nos itens 4.6 e 4.9

Os pulmões e fígado dos animais foram retirados e, por meio da randomização, separados em órgãos para a recuperação de larvas L3 de *T. canis* e órgãos armazenados em formalina tamponado 10% para posterior análise histopatológica.

4.3. Obtenção de Adultos de *Toxocara canis*

Adultos de *T. canis* foram recuperados do material fecal de cães tratados para as helmintoses intestinais pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da região metropolitana de Belo Horizonte – Minas Gerais, sediado no bairro São Bernardo. Os vermes recolhidos foram armazenados em potes contendo tampão fosfato-salino (PBS) 1x (Fórmula: 10,5gr de $Na_2 HPO_4$, 3,55gr de $NaH_2 PO_4 + H_2O$ e 82gr de $NaCl$ diluídos em 1L de $H_2O[d]$ com pH 7,2).

No Laboratório de Helmintoses Intestinais (LHI) os vermes adultos foram lavados em água corrente, seguido por submersão em PBS - 1x por 3 vezes consecutivas por 10 minutos cada vez. Após, os vermes adultos foram depositados em placas de Petri com PBS - 1x para serem verificadas caracteres específicos pertencentes a espécie *T. canis* (Werner, 1758).

Para a verificação de caracteres traçou-se 3 (três) etapas. Na primeira etapa observou-se caracteres macroscópicas, como o tamanho do verme entre 4 e 18 cm, corpo cilíndrico, falta de segmentação, cor esbranquiçada e revestimento de cutícula quitinosa. Os vermes que possuíam essas características foram direcionados para a verificação na segunda etapa (Radwan, Khalil, El Mahi, 2009; Taylor, Coop, Wall, 2017).

Na segunda etapa foram considerados caracteres microscópicos como a presença de três lábios bem definidos, asas cefálicas estreitas e semi-lanceoladas. Em continuidade ao processo, os animais seguiram para análise da terceira etapa quanto aos caracteres de dimorfismo sexual (Radwan, Khalil, El Mahi, 2009; Taylor, Coop, Wall, 2017).

Para a terceira etapa do dimorfismo sexual verificamos o tamanho do verme e a constituição da sua parte posterior. Com isso, vermes adultos apresentando medidas entre 4 a 10 cm, com região caudal com pequeno processo digitiforme, presença de espículos desiguais e cauda curvada, foram classificados como machos e vermes como medida entre 5 a 18 cm, com cauda reta, foram classificados como fêmeas (Radwan, Khalil, El Mahi, 2009; Taylor, Coop, Wall, 2017).

Com a classificação dos vermes adultos como pertencentes a espécie *T. canis*, e a diferenciação entre machos e fêmeas (Figura 7A), realizamos o depósito dos machos em pote devidamente identificado contendo formalina 10% tamponado, para serem utilizados posteriormente nas aulas práticas da pós-graduação ou graduação do Departamento de Parasitologia (Figura 7B).

Enquanto as fêmeas foram distribuídas em dois grupos, possuindo cada 25 fêmeas, que foram submetidas ao procedimento descrito no item 4.4 para a obtenção dos ovos, que foram utilizados posteriormente na inoculação de 100 e 1.000 ovos larvados nos animais experimentais.



Figura 7: Vermes adultos de *Toxocara canis*. (A) A esquerda da foto vermes machos e a direita vermes fêmeas. (B) Vermes adultos fêmeas de *Toxocara canis* preservados em formalina 10%.

4.4. Obtenção de ovos de *Toxocara canis* e embrionamento

Os ovos foram diretamente obtidos do útero das fêmeas, por meio de método modificado embasado na metodologia descrita por Peixoto (*et al*, 2011) e Resende (*et al*, 2015).

Com isso, as fêmeas foram fixadas por agulha em isopor coberto com papel alumínio e dissecadas com bisturi (Figura 8A), havendo remoção do útero e colocação em placa contendo 1 mL de solução acidificada (Fórmula: $H_2O[d]$ com adição de HCl até chegar ao pH 3,0). Em seguida, os úteros foram depositados em gral de porcelana, e por meio de pistilo de porcelana de base arredondada, ocorreu a maceração do tecido de maneira mecânica (Figura 8B). Após a maceração, houve precipitação dos ovos e limpeza do material macerado, por meio, de processo de sedimentação.



Figura 8: Obtenção de ovos de *Toxocara canis* e embrionamento. (A) Verme adulto fêmea aberta longitudinalmente para retirada do útero. (B) Maceração do útero das fêmeas com gral e pilão, com adição de 1 mL de solução acidificada. (C) Frasco de cultura com suspensão de ovos.

Para a sedimentação o material no pilão recebeu a adição de 2 mL de solução salina isotônica (Fórmula: 8,5gr de $NaCl$ diluído em 1L de $H_2O[d]$ com pH 6,0) com transferência para tubo de centrifugação de 15 mL, que passaram por centrifugação 2 vezes por 10 minutos à 1.000 rpm, entre as centrifugações o sobrenadante foi descartado e adicionado 2 mL de solução salina. Ao final do procedimento, houve a transferência do pellet da sedimentação para frascos de cultura de 250 mL, havendo adição de 1 mL da solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 concentrado, com concentração final de 17,8mol/L) mais 49 mL de solução salina, com isso, obtivemos um volume final nos frascos de cultura de 50 mL (fotografia 8C).

Os frascos de cultura foram mantidos em câmara de temperatura controlada de 26 ± 1 °C e processos de oxigenação, por agitação manual, com retirada da tampa com agitação do líquido por 1 minuto, ocorreram uma vez ao dia. O desenvolvimento embrionário dos ovos foi controlado por análises microscópicas, por meio de microscópio de luz com aumento de 10x e 40x respectivamente, uma vez por semana, com alíquotas de 20 μ L de suspensão de ovos.

4.4.1. Verificação do desenvolvimento dos ovos de *Toxocara canis*

A verificação do desenvolvimento dos ovos foi realizada de forma quantitativa, por meio de microscopia de luz a cada 7 dias, após a montagem da cultura. A preparação de 1 lâmina, com alíquota de 20 μL , de suspensão homogeneizada dos ovos larvados foi verificada em aumento de 10x com confirmação em aumento de 40x seguindo-se a obtenção dos dados durante 6 semanas de cultura.

Para classificar os ovos utilizamos da descrição feita por Abou-El-Naga (2018). Logo, os ovos presentes nas lâminas foram classificados como Ovos Embrionados (OE) que seriam ovos em processo de clivagem celular, com estágio pré-larva, primeiro estágio larval, segundo estágio larval, terceiro estágio larval e larva com emergência natural do ovo; e ovos Não Viáveis (ONV) que possuíam citoplasma condensado, e/ou citoplasma com vacúolo, e/ou degeneração citoplasmática, e/ou ovos colapsados (Figura 9 A e B).

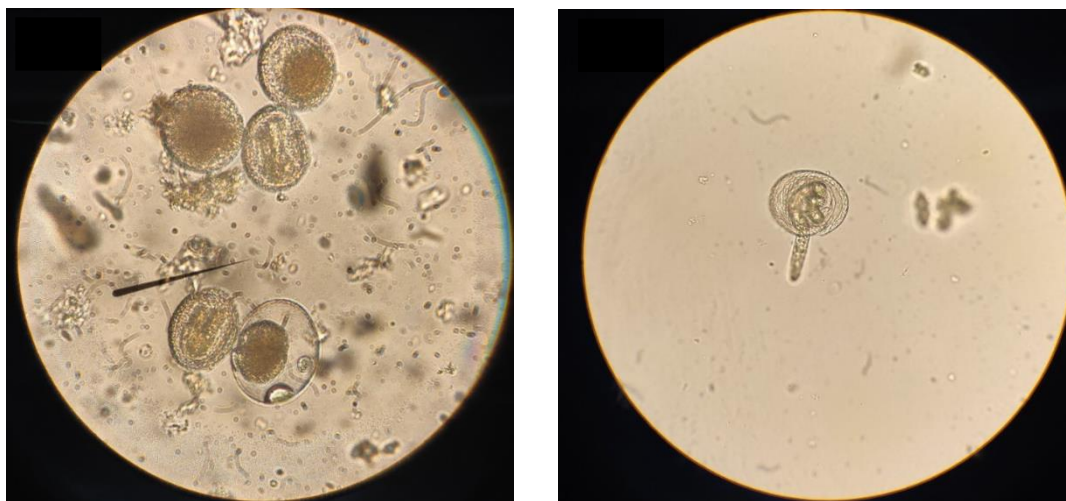


Figura 9: Verificação do desenvolvimento dos ovos de *Toxocara canis*. (A) Ovos de *Toxocara canis* com uma célula apenas (a), estágio de mórula (b), pré-larva (c) e ovo não viável (d). (B) Larva de terceiro estágio (L3) emergindo do ovo. Aumento de 40x.

A classificação dos ovos foi empregada como forma de quantificar quantos ovos potencialmente infectantes existiriam aproximadamente na cultura, pois se buscou um percentual de mais de 60% de ovos infectantes dentro da cultura, para que alíquotas com quantidades de ovos infectantes referente a infecção experimental, 100 ou 1.000 ovos potencialmente infectantes, pudessem ser utilizadas nos animais experimentais.

4.5. Infecção experimental

A infecção experimental ocorreu com ovos larvados há 6 semanas em cultura. Para a inoculação, a cultura de ovos foi lavada por 5 vezes em PBS 1x por 5 minutos, cada vez, para remoção do ácido sulfúrico.

A inoculação dos ovos larvados ocorreu por dosagem única, por via intra-gástrica. A distribuição de ovos larvados foi em acordo com a distribuição de ovos por grupo, o grupo G100 recebeu 100 ovos potencialmente infectantes e o grupo G1000 1.000 ovos potencialmente infectantes, em 0,2 mL de solução salina isotônica (Fórmula: 8,5gr de NaCl diluído em 1L de H_2O [d] com pH 6,0), seguida por lavagem da seringa e agulha em água (H_2O) para retirada de ovos que permaneceram (Resende *et al*, 2015). O grupo AC recebeu o volume de 0,2 mL de água (H_2O).

4.6. Análise do processo infeccioso por meio da recuperação de larvas L3

Para a recuperação de larvas L3 dos animais experimentais, foi utilizado método modificado de Baermann e Moraes, sendo o método em todo o fígado e pulmões. No encéfalo empregamos uma divisão em acordo com sua anatomia, em cérebro e cerebelo, sendo empregado em cada porção encefálica o método de Baermann e Moraes (Figura 10).

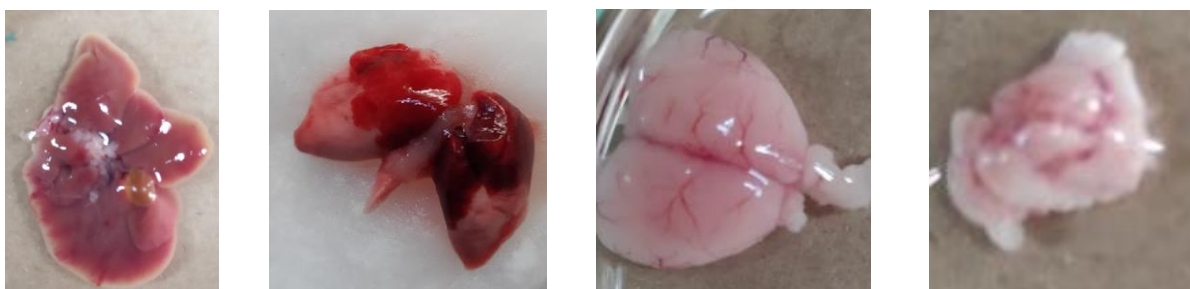


Figura 10: Caracterização da migração larval, recuperação de larvas L3 de BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*. (A) Fígado de BALB/c infectado com ovos embrionados de *Toxocara canis*. (B) Pulmões de BALB/c infectado com ovos embrionados de *Toxocara canis*. (C) Cérebro de BALB/c infectado com ovos embrionados de *Toxocara canis*. (D) Cerebelo de BALB/c infectado com ovos embrionados de *Toxocara canis*.

O emprego do método de Baermann e Moraes ocorreu no momento 14DPI, com o N de 7 animais infectados para cada grupo, e no momento 42 DPI do estudo, com o N de 7 animais do grupo G100 e 10 animais do grupo G1000.

Os órgãos desses animais foram coletados e encaminhados para o processo de maceração (Figura 9), no qual se utilizou placas de petri e tesouras cirúrgicas de ponta fina, assim como bisturi para maceração do tecido.

Em seguida os tecidos foram depositados separadamente em Parasitofiltro® sobre um tubo de centrifugação de 15 mL. Ao tubo, foi adicionado PBS 1x aquecido a 37°C, até a submersão do órgão macerado, ocorrendo repouso de o material em banho maria pôr no mínimo 1 hora e meia (Figura 11) (Rocha e Costa, 2016).



Figura 11: Órgãos de BALB/c mantidos em banho maria (37°C) para a recuperação de larvas L3 de *Toxocara canis*.

Após o processamento, pela técnica modificada de Baermann e Moraes, os tubos foram centrifugados a 1.000 RPM durante 10 minutos. Havendo nova centrifugação do material que ainda continha alguma turbidez. Com a finalização da centrifugação, houve remoção do sobrenadante, e ao pellet foi adicionado 1 mL de PBS 1x.

O conteúdo obtido do processo de centrifugação foi verificado em microscopia, por meio do Microscópio Zeiss Primo Star nas objetivas com aumento de 10x e 40x, respectivamente. Após a leitura de todo o fluído, o tubo foi lavado com pequeno volume de PBS 1x, em busca de larvas L3 que poderiam ter se mantido no tubo.

4.7. Análise do estado fisiológico dos animais infectados por meio do peso corporal

Para analisar os efeitos da infecção por *T. canis* nos aspectos fisiológicos dos animais, realizamos pesagem de todos os animais nos tempos da infecção -1TAI, 7DPI, 14DPI e 42DPI, por meio de balança digital doméstica.

4.8. Identificação do impacto psicobiológico da infecção por meio de testes comportamentais

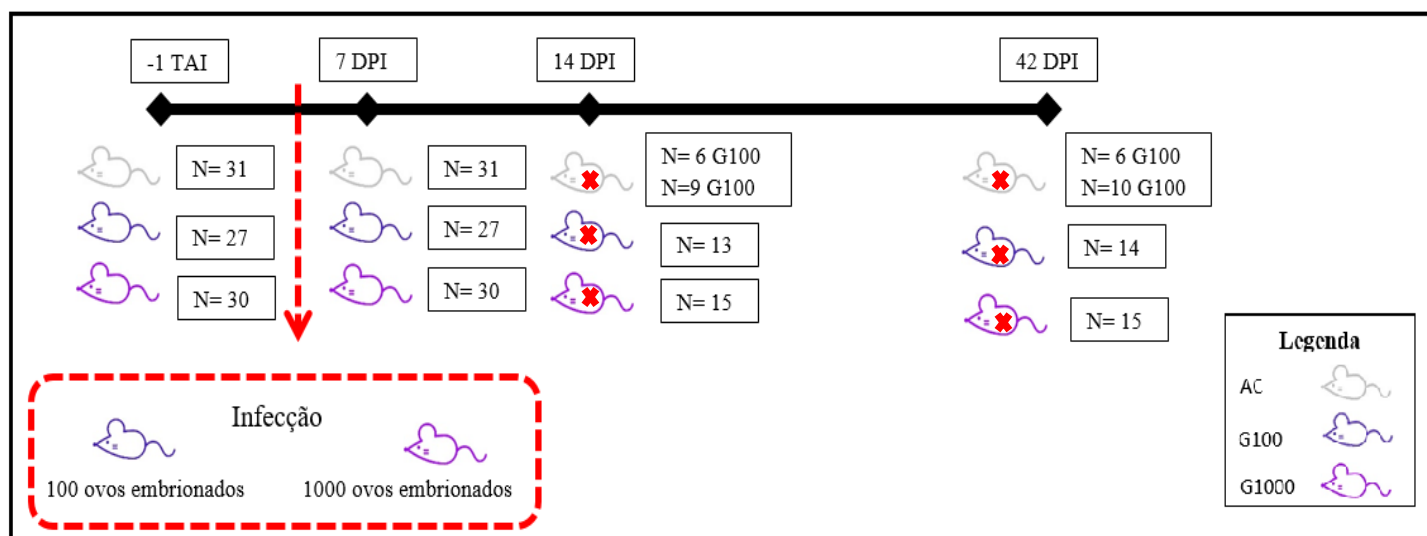
Para analisar as alterações causadas pelas larvas L3 nos animais em sentido psicobiológico da infecção por *T. canis* nos animais experimentais, utilizamos testes advindos da psicobiologia experimental, para que parâmetros de alterações causados pela larva L3 fossem descritos. Logo, análises nos tempos da infecção -1TAI, 7DPI, 14DPI e 42DPI foram realizados por meio do teste de Neofagia e teste do Nado Forçado (Fluxograma 2).

Os experimentos ocorreram entre 8 e 16:00 horas, com registros por câmera de vídeo. Os experimentos foram realizados no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais e no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Nesses locais, com o intuito de minimizar o estresse e aumentar a familiaridade dos animais, todos os testes foram aplicados em locais com a presença apenas dos pesquisadores.

Os animais controle (AC – N=31), infectados com 100 ovos larvados (G100 – N=27) e infectados com 1.000 ovos larvados (G1000 – N=30), foram em sua totalidade submetidos aos testes psicobiológicos antes da infecção (-1TAI) e após 7 dias de infecção (7DPI).

Após a análise dos animais nesses dois momentos da infecção, houve separação dos animais de acordo com o momento da eutanásia, 14 dias após a infecção (14DPI) e 42 dias após a infecção (42DPI). Com isso, o N dos grupos do 14DPI foi de AC=6 animais para o grupo G100, que tinha um N de 13 animais, e AC=9 animais para o grupo G1000, que tinha um N de 15 animais. Os grupos do 42DPI foram divididos em um N de 14 para o grupo G100 e com AC de 6 animais, e o grupo G1000 um N de 15 animais com o AC de 10 animais.

Os testes foram aplicados em dias consecutivos, iniciando-se em até quatro dias antes da eutanásia, e as análises dos vídeos foram realizadas por meio do programa X-PloRat (USP) versão 2005 de maneira não cega.



Fluxograma 3: Delineamento dos experimentos psicobiológicos.

4.8.1. Neofagia: Novelty Suppressed Feeding

Para o teste de Neofagia os animais foram submetidos a um jejum entre 16 e 18h que ocorria anteriormente ao teste.

Na aplicação do teste foram utilizadas caixas plásticas brancas (34cm x41cm x 18cm), forradas com serragem e com um círculo de papel branco de 15 cm de diâmetro no meio da caixa (Figura 12), que continha sobre ele uma quantia mensurada de ração padrão de 5 a 7g.

Os animais foram colocados individualmente na caixa e avaliados por 30 minutos, sendo o tempo de experimentação gravado em vídeo. Durante o momento experimental o animal passou pelo conflito entre explorar/temer o ambiente novo ou se alimentar.

Com esse testes buscamos avaliar os parâmetros em relação a quantidade de ração ingerida, a latência para o início da alimentação e o peso do animal antes e após o jejum.



Figura 12: Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c experimentalmente infectados com ovos embrionados de *Toxocara canis* realizando o teste de Neofagia.

4.8.2. Teste do nado forçado

A aplicação do teste em camundongos não requer familiarização, mas há adaptações metodológicas para o animal, com isso, utilizamos recipientes cilíndricos transparentes contendo um volume de água de até 14cm de altura.

A aplicação do teste ocorreu durante o período de 6 minutos, sendo o mesmo documentado em vídeo para posterior análise e computação dos comportamentos de imobilidade e nado (Figura 13).

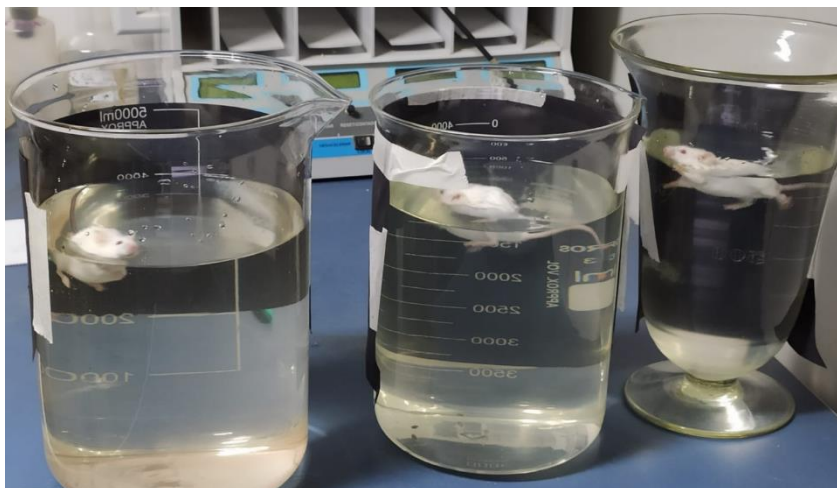


Figura 13: Animais BALB/c infectados com ovos embrionados de *Toxocara canis* realizando o teste do Nado Forçado.

4.9. Análise dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como marcador da infecção

Para caracterizar a resposta imunológica sistêmica durante a infecção por *T. canis*, e comprovar a infecção dos animais, realizamos coleta de sangue nas fases subaguda (14DPI) e crônica (42DPI).

O sangue a ser analisado foi coletado por exsanguinação do globo ocular. Sendo o soro desse sangue utilizado para testar níveis de citocinas e quimiocinas, por método de ELISA. Com isso, após a coagulação sanguínea por 30 minutos, o sangue foi centrifugado em 1.000RPM por 10 minutos como forma de obtenção do soro. O soro foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

Para análise do soro foram utilizadas placas de 96 poços com área reduzida (Half Area Microplates) e alta capacidade de ligação (Costar Corning), que receberam sensibilização com 25µL de tampão de diluição (0,1 g de Albumina de Soro Bovino diluído em 100 mL de PBS 1x) e anticorpo de captura, em cada poço.

Os anticorpos de captura utilizados foram específicos para as citocinas TNF- α e IL-6, e para as quimiocinas CCL17, CCL5 e CCL24, conforme a concentração indicada pelo fabricante (R&D Systems) para cada kit. Em seguida, as placas foram seladas com papel filme e deixadas por *overnight*, por um período mínimo de 18 horas e máximo de 24 horas, em temperatura ambiente.

Junto ao *overnight* das placas sensibilizadas, houve o *overnight* das amostras de soro em placa de transferência de 96 poços, em acordo com o desenho experimental. Foi

utilizado um volume total por poço de 75 μ L, sendo em seguida, a placa lacrada com a tampa e permanecendo por *overnight* em *freezer* -20°C.

Após o período de sensibilização das placas contendo os anticorpos de captura, as mesmas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem (1 L de PBS 1x com adição de 500 μ L de Tween - 20) e receberam 75 μ L de tampão de bloqueio (1 g de Albumina de Soro Bovino [BSA] diluído em 100 mL de PBS 1x), permanecendo as placas por 40 minutos em temperatura ambiente em incubação. Após esse período de incubação, as placas receberam nova lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem.

Em seguida as lavagens, ocorreu adição das respectivas citocinas e quimiocinas recombinantes, que foram diluídas em cada placa correspondente conforme as instruções do fabricante. Com isso, adicionou-se na linha 'A' e 'B' colunas 1 e 2 da placa, 25 μ L de citocinas e quimiocinas de interesse, em duplicata. A partir da linha 'B' nas colunas 1 e 2 em duplicata, 25 μ L de tampão de diluição foi adicionado aos poços até os poços da linha 'H' coluna 1 e 2. Em seguida, a amostra da linha 'B' foi homogeneizada e retirou-se 25 μ L, que foi passado para o poço da linha 'C', tal procedimento se deu até a linha 'H', na qual se retirou os 25 μ L restantes para descarte. Esse método acarretou a construção da curva padrão, que serviu como base para entendermos os níveis de citocinas e quimiocinas testados.

Em seguida foi realizada uma diluição 1:2 nas amostras ainda na placa de transferência, recebendo cada amostra 75 μ L de tampão de diluição, que em seguida foram distribuídas nas placas contendo as citocinas e quimiocinas. Da coluna 3 a coluna 5 de cada placa, houve a distribuição das amostras referentes ao G1000, tempos 14DPI e 42DPI. Enquanto, da coluna 6 a coluna 9, foram destruídas as amostras do grupo G100 dos tempos 14DPI e 42DPI. A coluna 11 e 12 receberam amostras diluídas do grupo AC referentes aos tempos 14DPI e 42DPI. A distribuição das amostras ocorreu em forma de unicata, e após esse procedimento, as placas seguiram para nova incubação em temperatura ambiente por 2 horas.

Próximo ao tempo de 2 horas, os anticorpos de detecção, de cada citocina e quimiocina, foram diluídos em 2,7 mL de tampão de diluição e reservados em temperatura ambiente. Com o término das 2 horas, ocorreu a lavagem das placas por 3 vezes com tampão de lavagem, e posterior adição de 25 μ L de anticorpo de diluição por poço, na placa específica para cada citocina e quimiocina.

Em seguida, ocorreu incubação da placa em temperatura ambiente por 2 horas e lavagem das placas por 3 vezes com tampão de lavagem. Após a lavagem houve a adição

de 25 µL de streptoavidina conjugada à peroxidase diluído 1:2000 e nova incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, ocorreu nova lavagem das placas por 3 vezes com tampão de lavagem, para em seguida ocorrer a adição de 25 µL de substrato diluído, com incubação de 20 minutos em temperatura ambiente.

Com o fim do período de incubação a reação foi parada com 20 µL de H_2SO_4 2N e as placas seguiram para a leitura com medição da absorbância por meio de leitor de ELISA (VersaMax, Molecular Devices, California, EUA).

A absorbância foi analisada pelo comprimento de onda de 450nm e as concentrações de citocinas e quimiocinas foram estabelecidas por interpolação com as informações da curva padrão utilizando o programa Softamax Pro 7.1.

4.10. Identificação de alterações patológicas na infecção por meio da histopatologia

Para a avaliação dos aspectos fisiopatológicos da infecção por meio da histopatologia, foram removidos dos animais, após a eutanásia no momento 14DPI e 42DPI, o fígado, pulmões e encéfalo, que foram preservados em solução formol tamponado de 10% (Fórmula: 21,25gr de NaH_2PO_4 , 32,5gr de Na_2HPO_4 , diluídos em 500mL de CH_2O 37% e 4.500mL de $H_2O[d]$ com pH 6,8) até o momento dos cortes histológicos.

4.10.1. Histopatologia pulmonar e hepática – Processamento tecidual em bloco de parafina com coloração em hematoxilina e eosina (HE)

O pulmão murino possui uma estrutura que consiste em pulmão esquerdo sem fissuras e lóbulos, enquanto o pulmão direito possui quatro lóbulos: superior, mediano, inferior e pós-cava (Figura 14). Logo, para os cortes histológicos realizamos a divisão de acordo com a anatomia do pulmão.

Nossas análises ocorreram em cima do pulmão direito, que foi dividido de acordo com os lóbulos e o esquerdo, que permaneceu inteiro. O material foi devidamente identificado e colocados em cassetes histológicos, gerando cada cassete uma lâmina histológica com cinco fragmentos.

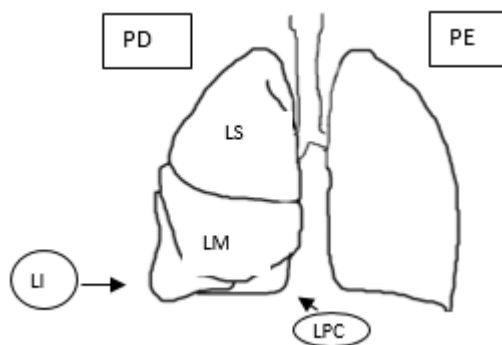


Figura 14: Vista ventral do pulmão murino. Pulmão esquerdo (PE) sem fissuras e lóbulos, o pulmão direito (PD) possui quatro lóbulos: superior (LS), mediano (LM), inferior (LI) e pós-cava (LPC). (Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

Já o fígado, que possui quatro lobos, o medial, o esquerdo, o direito e o caudado (Figura 15) foi dividido utilizando-se o lobo esquerdo do fígado para os cortes histológicos. O mesmo, foi subdividido ao meio e os fragmentos foram depositados no cassete histológico com identificação, gerando assim, cada cassete uma lâmina histológica com dois fragmentos.

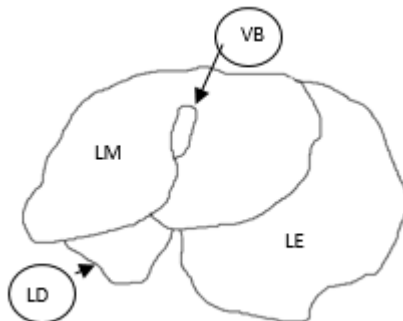


Figura 15: Vista ventral do fígado murino. Lobo esquerdo (LE), lobo direito (LD) lobo medial (LM), inferior (LI) e vesícula biliar (VB). (Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

As lâminas histológicas foram elaboradas em laboratório comercial da cidade de Belo Horizonte, CelulaVet, onde os fragmentos dos órgãos passaram por lavagem em água corrente e sofreram desidratação ao serem passados em 5 álcoois e 3 xilóis, para em seguida serem montados em 2 parafinas. Cada etapa necessitou de um tempo de 30 minutos.

Após, a montagem dos blocos de parafina contendo os fragmentos dos órgãos, ocorreu os cortes com 4 μ m de espessura no micrometro, que em seguida foram fixados

em lâmina de microscopia devidamente identificada. As lâminas com os cortes receberam coloração de hematoxilina e eosina (HE) para ser realizada a avaliação do dano tecidual considerando a intensidade da inflamação (Melo, 2009).

A avaliação das lâminas ocorreu por análise semiquantitativa, em microscópio óptico de campo de luz acoplado com câmera, para captura de imagens por sistema digital (Motic 2.0, Hong Kong, China).

Para os pulmões houve análise de score da inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima, e presença de hemorragia com captura de 10 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X. Onde score é baseado em 6 graus para inflamação das vias aéreas sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas possuem um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias respiratórias possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 a maioria das vias aéreas estão significativamente inflamadas (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave). (Oliveira *et al*, 2019).

Para inflamação perivascular, também foi utilizado o score baseado em 6 graus sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos vasos (ausente); grau 1 alguns vasos possuem um pequeno número de células inflamatórias (discreta); grau 2 alguns vasos possuem inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria dos vasos possuem alguma inflamação (acentuada); grau 4 A maioria dos vasos estão significativamente inflamados (intenso); grau 5 todos os vasos estão completamente inflamados. Do mesmo modo o score para inflamação do parênquima foi baseado em 6 graus sendo: grau 0 igual a menos que 1% do parênquima afetado; grau 1 de 1 a 9% do parênquima afetado; grau 2 de 10 a 29% do parênquima afetado; grau 3 de 30 a 49% do parênquima afetado; grau 4 de 50 a 69% do parênquima afetado; grau 5 mais de 70% do parênquima afetado) (Oliveira *et al*, 2019).

Para o score das lesões hepáticas foram capturadas 20 imagens aleatórias por animal com aumento de 20X. O score foi baseado em 4 graus para lesão do parênquima hepático: grau 0 ausência de células inflamatórias em torno dos hepatócitos, vasos sanguíneos, ductos biliares e capilares, ausência de zonas de necrose (ausente); grau 1 algumas regiões do parênquima hepático possuíam pequenos focos inflamatórios com reduzido número de células inflamatórias, pequenas zonas de necrose (discreto); grau 2 o parênquima hepático apresentava focos inflamatórios com número moderado de células, infiltrado inflamatório perivascular, bem como em torno dos ductos e pequenas zonas de

necrose dispersas pelo parênquima (moderada); grau 3 parênquima hepático apresentava com frequência focos inflamatórios maiores, infiltrado inflamatório difuso, exuberante inflamatório perivascular e em torno dos ductos, zonas de necrose dispersas pelo parênquima (intenso). (Oliveira *et al*, 2019).

Análise quanto a hemorragia pulmonar não ocorrera, visto que o método de eutanásia por decapitação, acarretou aspirado sanguíneo pulmonar, inviabilizando assim as análises da hemorragia. Quanto ao fígado, foram realizadas análises equivalentes as utilizadas no pulmão, considerando-se a morfometria do parênquima hepático e a presença de granulomas.

4.10.2. Histopatologia encefálica – Processamento tecidual em criomicrotomia com coloração de Nissl

Na histopatologia encefálica foi utilizado um método diferente, no qual as lâminas histológicas foram preparadas em criomicrotomia em colaboração com o Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os encéfalos preservados em solução formol tamponado 10% (Fórmula: 21,25gr de NaH_2PO_4 , 32,5gr de Na_2HPO_4 , diluídos em 500mL de CH_2O 37% e 4.500mL de $H_2O[d]$ com pH 6,8), foram transferidos para solução de 30% sacarose (Fórmula: 1.00mL tampão PB 0,1M e 30g de sacarose) permanecendo por tempo mínimo de 48 horas.

Em seguida, os encéfalos foram retirados da solução de sacarose 30% e posicionados no disco de corte do criostato, sendo fixados neste pelo meio de congelamento de tecido (*Tissue Freezing Medium*).

Após o congelamento dos encéfalos a $-18^{\circ}C$, houve seccionamento do tecido no Leica Cryostat CMI850® em fatias de 100 μm . As secções foram colocadas em solução salina e montadas em lâmina gelatinizada. As fatias restantes foram guardadas em solução crioprotetora (30% etilenoglicol, 25% glicerina e 45% PBS) e mantidas em temperatura $-20^{\circ}C$ para estudos posteriores. As lâminas montadas foram dispostas sobre a bancada para secar antes do processo de coloração.

Para a coloração foi utilizado cresil violeta pó 0,1g, água deionizada 100 ml, com adição de 15 gotas de ácido acético a 10%. O cresil violeta foi aquecido em estufa a $60^{\circ}C$ por 10 minutos, sendo as lâminas submersas no corante e levadas novamente à estufa por 5 a 10 minutos. Após a coloração com a solução de Nissl as lâminas foram mergulhadas em água destilada, para a retirada do excesso de corante, e lavadas em álcool 100%: por

60 segundos para desidratação do tecido. Em seguida, as fatias foram passadas para uma solução de etanol / xilol (1:1) por 60 segundos e posteriormente para uma solução de xilol 100% por 60 segundos. Ao final, as lâminas receberam uma solução de balsamo do Canadá e foram cobertas com lamínula de vidro.

Para a avaliação dos tecidos, foi utilizada microscopia de luz, nos aumentos de 5x, 10x e 40x, para verificar alterações morfológicas estruturais nas áreas do córtex-cerebral, hipotálamo, amígdala, hipocampo dorsal, hipocampo ventral e cerebelo (Figura 16).

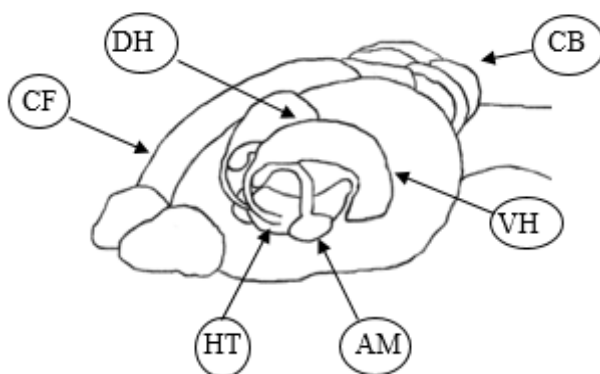


Figura 16: Encéfalo murino. Córtex pré-frontal (CF), hipotálamo (HT), amígdala (AM), Hipocampo dorsal (DH), hipocampo ventral (VH) e cerebelo (CB). (Fonte: Elaborado pelo autor, 2021).

4.11. Análise Estatística dos Dados

Para a análise estatística dos dados, utilizamos o programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Inc, EUA). Nele verificamos a normalidade de distribuição dos dados com os testes de Anderson-Darling e D'Agostino & Pearson, realizamos estatística descritiva e especificamos as análises de acordo com as amostras.

Na avaliação da migração larval de L3 de *T. canis* foi utilizado o teste T Mann-Whitney, seguido do cálculo da média percentual de larvas L3 encontradas.

Para os experimentos psicobiológicos utilizamos ANOVA Two Way com efeitos mistos com Geisser-Greenhouse seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni's,

Na análise dos aspectos inflamatórios da infecção, utilizamos ANOVA One-Way para dados não paramétricos, com o teste Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas Dunn's.

Quanto a análise histológica, utilizamos, ANOVA Two Way com efeitos mistos com Geisser-Greenhouse seguido do teste de comparações múltiplas Bonferroni's.

5. Resultados

5.1. Análise do processo infeccioso por meio da recuperação de larvas L3 na fase subaguda e crônica da infecção

A análise da infectividade das larvas L3 de *T. canis* na fase subaguda da infecção 14DPI e na fase crônica da infecção 42DPI, no modelo murino BALB/c, foi realizada por meio da recuperação de larvas em tecido pulmonar, hepático e encefálico, o qual foi subdividido em tecido cerebral e cerebelar. A técnica utilizada foi a de Baermann e Moraes modificada, com análise microscópica do pellet dos grupos de infectados G100 e G1000.

O grupo G100, composto por um N total de 14 animais, foi subdividido havendo na fase subaguda da infecção 14DPI um N de 6 animais e na fase crônica da infecção 42 DPI um N de 8 animais. Já no grupo G1000 o N total foi de 15 animais, sendo subdividido em 7 animais na fase subaguda da infecção 14DPI e 8 animais e na fase crônica da infecção 42DPI.

No grupo G100, em ambos os tempos de análise da infecção, não foram recuperadas larvas L3 dos pulmões, fígado e encéfalo (cérebro e cerebelo), resultado esse também obtido no grupo G1000 na análise dos pulmões.

Nos animais G1000 foram recuperadas larvas L3 do fígado de dois animais, havendo em cada, uma única larva L3 na fase subaguda da infecção 14DPI, obtendo assim as análises um percentual médio de 1% de larvas recuperadas no fígado.

Na recuperação larval do encéfalo dos 15 animais do grupo G1000, encontramos um número mínimo de 2 larvas L3 e um número máximo de 30 larvas L3, havendo um total de 102 larvas L3 recuperadas.

Desse total de larvas recuperadas, 38 larvas L3 foram encontradas em 7 animais na fase subaguda da infecção 14DPI, e 64 larvas L3 em 8 animais da fase crônica da infecção 42DPI. A porcentagem média de larvas L3 totais encontradas no encéfalo (Figura 17 A e B) foi de 7,4% com mediana de 51 larvas L3 recuperadas.

Na avaliação das fases de infecção, quanto ao total de larvas encontradas no encéfalo, houve uma porcentagem média de 6,1% e mediana de 19 larvas L3 recuperadas na fase subaguda da infecção 14DPI, e uma média de 8,8% com mediana de 34 larvas L3 recuperadas na fase crônica da infecção 42DPI.

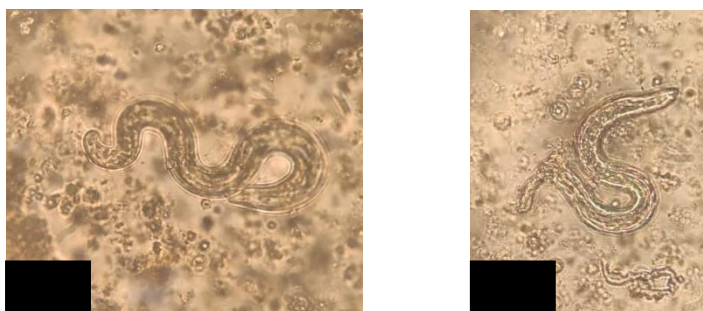


Figura 17: Larvas L3 recuperadas de tecido encefálico do grupo G1000. (A) Larva L3 de *Toxocara canis*, recuperação do encéfalo de animais infectado com 1.000 ovos embrionados, fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Larva L3 de *Toxocara canis*, recuperação do encéfalo de animais infectado com 1.000 ovos embrionados e na fase crônica da infecção 42DPI Aumento de 40x.

A partir desses dados realizamos uma análise comparativa entre o número total de larvas L3 recuperadas do encéfalo do grupo G1000 em cada fase de análise da infecção, subaguda 14DPI e crônica 42DPI, por meio do teste T com comparações feitas pelo teste Mann-Whitney. Essa análise apresentou uma não significância quanto ao número de larvas L3 recuperadas do encéfalo, como demonstra o gráfico 1.

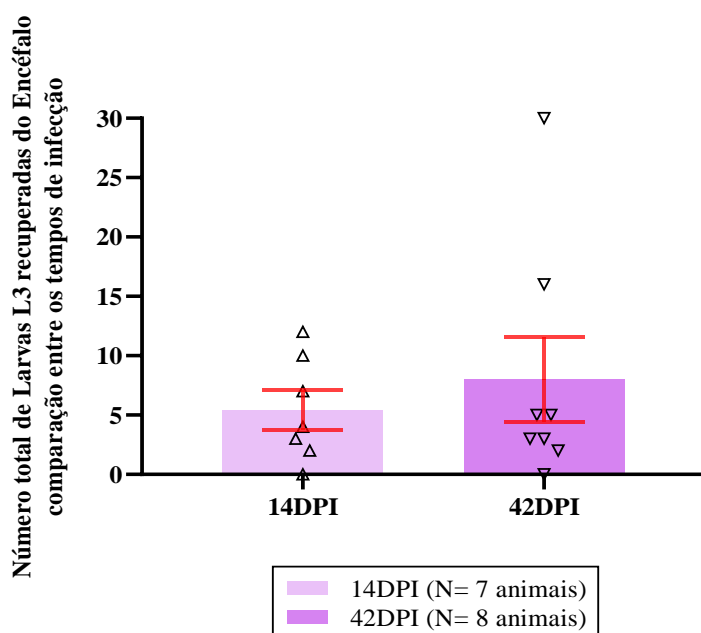


Gráfico 1: Carga parasitária recuperada dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. Número total de larvas L3 recuperadas do encéfalo do grupo G1000 nas fases subaguda 14DPI e crônica 42DPI, comparação entre os tempos de infecção. Resultados apresentados nos gráficos com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise comparativa utilizando o teste Mann Whitney.

Realizamos análise comparativa da recuperação de larvas L3 do grupo G1000 do tecido encefálico subdividido. Nessa análise, dos 15 animais, recuperamos um total de 71 larvas L3 do cérebro, enquanto no cerebelo recuperamos um total de 31 larvas L3. Com isso, a porcentagem média de larvas L3 recuperadas do cérebro foi de 5,3% com uma mediana de 3 larvas L3 recuperadas, já no cerebelo foram recuperadas uma média de 2,3% com mediana de 1 larva L3 recuperada.

A comparação das áreas se deu por meio do teste T com análises feitas pelo teste Mann-Whitney, levando ao resultado de não significância quanto ao número de larvas L3 recuperadas do cérebro e do cerebelo, como demonstrado no gráfico 2.

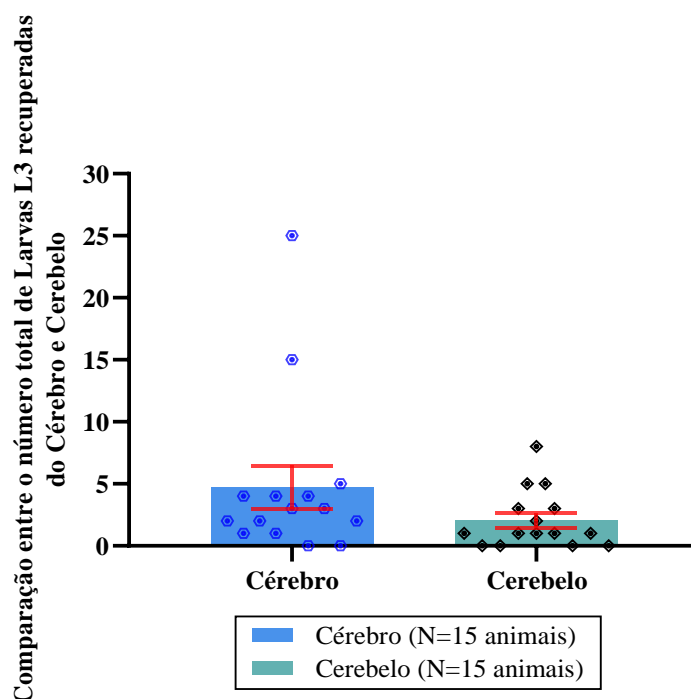


Gráfico 2: Carga parasitária recuperada do cérebro e cerebelo de camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*. Comparação entre número de larvas recuperadas do cérebro e do cerebelo do grupo G1000.

Resultados apresentados nos gráficos com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise comparativa utilizando o teste Mann Whitney.

Ao realizamos uma análise da subdivisão do encéfalo comparando o total de larvas L3 recuperadas de forma temporal, encontramos na fase subaguda da infecção 14DPI, 20 larvas L3 no cérebro e 18 larvas L3 no cerebelo de 7 animais, sendo a porcentagem média de 3,2% com mediana de 3 larvas L3 no cérebro e porcentagem média de 2,9% com mediana de 1 larva L3 no cerebelo. Já na fase crônica da infecção 42DPI, encontramos 51 larvas L3 no cérebro e 13 larvas L3 no cerebelo de 8 animais, com porcentagem média

de 7,0% e mediana de 26 larvas L3 no cérebro e porcentagem média de 1,8% com mediana de 7 larvas L3 no cerebelo.

A análise comparativa entre esses resultados do grupo G1000, decorreu por meio do teste T com comparação feitas pelo teste Mann-Whitney, obtendo-se uma não significância quanto ao número de larvas L3 recuperadas do cérebro, como demonstrado no gráfico 3^a, e no cerebelo, como demonstrado no Gráfico 3B.

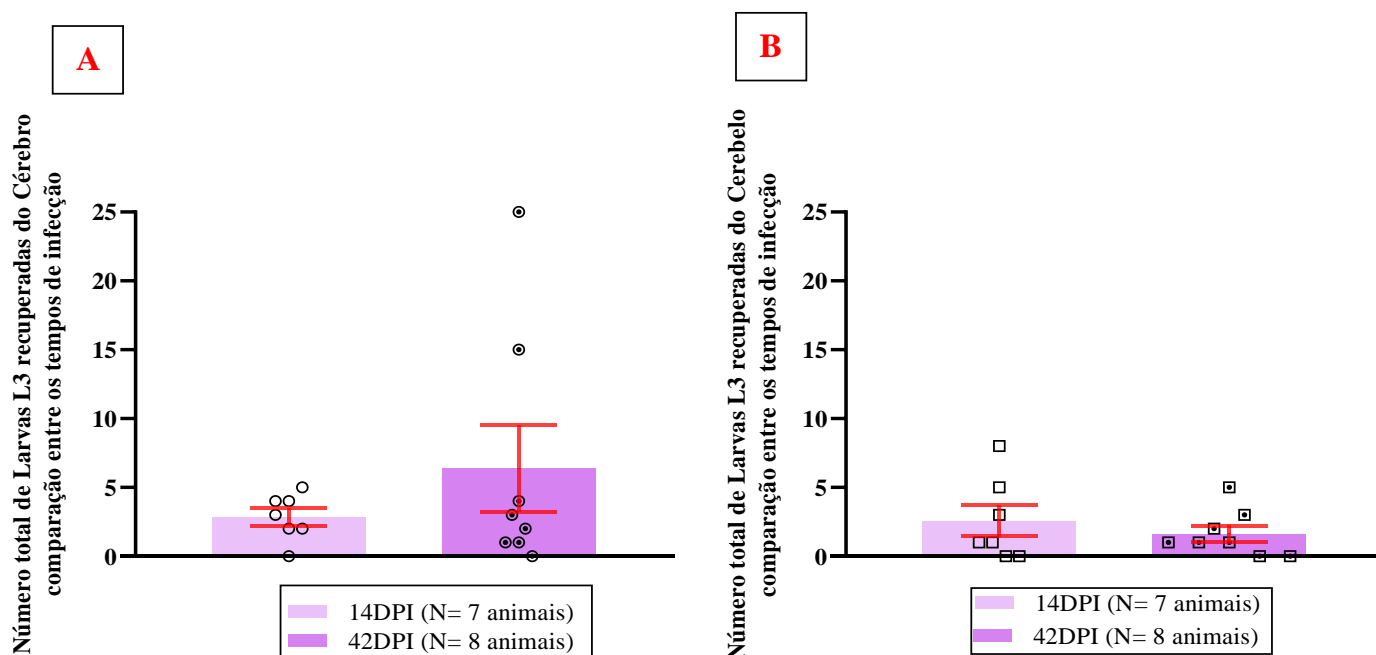


Gráfico 3: Carga parasitária recuperada dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Número total de larvas L3 recuperadas do cérebro do grupo G1000 nas fases subaguda 14DPI e crônica 42DPI. (B) Número total de larvas L3 recuperadas do cerebelo do grupo G1000 nas fases subaguda 14DPI e crônica 42DPI.

Resultados apresentados nos gráficos com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise comparativa utilizando o teste Mann Whitney.

5.2. Análise do estado fisiológico dos animais por meio da análise comparativa temporal do peso corporal

Ao analisarmos a média de peso dos grupos de animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 4A), os comparando durante os tempos de análise da infecção, observamos que o grupo AC, grupo controle sem infecção que passou pelas mesmas condições do grupo de infectados, apresentou significância entre os tempos

-1TAI (\bar{x} =19,5g) e o tempo 7DPI (\bar{x} =17,3g), com um aumento de 11,2% ($P \leq 0,01$) na média de peso no tempo 7DPI.

Na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =19,5g) e 14DPI (\bar{x} =18,3g), não foi encontrada significância, mas encontramos uma diminuição de 6,1% na média de peso no tempo 14DPI, e na comparação entre 7DPI (\bar{x} =17,3g) e 14DPI (\bar{x} =18,3g), encontramos significância e um aumento de 5,7% ($P \leq 0,05$) na média de peso no tempo 14DPI.

A comparação do grupo G100 (Gráfico 4A), entre seus tempos de análise da infecção, não apresentou diferenças significativas na média de peso dos animais, mas, foi observada na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =18g) e 7DPI (\bar{x} =17g) uma diminuição de 5,5% na média de peso no tempo 7DPI.

Entre os tempos -1TAI (\bar{x} =18g) e 14DPI (\bar{x} =17,8g), verificamos uma diminuição de 0,8% na média de peso no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =17g) e 14DPI (\bar{x} =17,84g), ocorrendo um aumento de 4,9% na média de peso no tempo 14DPI.

A análise comparativa dos grupos AC e G100 (Gráfico 4A), em acordo com os tempos de análise, não apresentou diferenças significativas, mas encontramos diferenças entre as médias no tempo -1TAI (AC \bar{x} =19,5g; G100 \bar{x} =18g), com diminuição de 7,6% na média de peso do grupo G100.

No tempo 7DPI (AC \bar{x} =17,3g; G100 \bar{x} =17g) encontramos uma diminuição de 1,7% na média de peso do grupo G100, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =18,3g; G100 \bar{x} =17,8g), encontramos diminuição de 2,7% na média de peso do grupo G100.

Ao analisarmos os grupos AC e G100 eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 4B), encontramos no grupo AC uma não significância na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =19,5g) e tempo 7DPI (\bar{x} =18,8g), mas houve uma diminuição de 3,5% na média de peso no tempo 7DPI.

A comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =19,5g) e 42DPI (\bar{x} =20,3g), não apresentou significância, mas encontramos um aumento de 4,1% na média de peso no tempo 42DPI, e a comparação entre 7DPI (\bar{x} =18,8g) e 42DPI (\bar{x} =20,3g), apresentou significância e um aumento de 7,9% ($P \leq 0,01$) na média de peso no tempo 42DPI.

O grupo G100 (Gráfico 4B), apresentou na comparação dos tempos -1TAI (\bar{x} =18,3g) e 7DPI (\bar{x} =17,6g), uma não significância com diminuição de 3,8% na média de peso no tempo 7DPI.

Nos tempos -1TAI (\bar{x} =18,3g) e 42DPI (\bar{x} =19,5g) encontramos significância e um aumento de 0,8% ($P \leq 0,05$) na média de peso no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =17,6g) e 42DPI (\bar{x} =19,5g), encontramos significância e um aumento de 10,7% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI.

A análise comparativa dos grupos AC e G100 (Gráfico 4B), em acordo com os tempos de análise, não apresentou diferenças significativas, mas encontramos diferenças entre as médias no tempo -1TAI (AC \bar{x} =19,5g; G100 \bar{x} =18,3g) com diminuição de 6,1% na média de peso do grupo G100, no tempo 7DPI (AC \bar{x} =18,8g; G100 \bar{x} =17,6g) com diminuição de 6,3% na média de peso do grupo G100, e no tempo 42DPI (AC \bar{x} =20,3g; G100 \bar{x} =19,5g) com diminuição de 3,9% na média de peso do grupo G100.

Ao analisarmos o peso dos animais do grupo G1000 e seus controles AC, animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 4C), encontramos no grupo AC, uma não significância na média de peso dos animais nos tempos -1TAI (\bar{x} =17g) e 7DPI (\bar{x} =16,8g), com diminuição de 1,2% na média de peso no tempo 7DPI.

Nos tempos -1TAI (\bar{x} =17g) e 14DPI (\bar{x} =18,7g), encontramos significância e um aumento de 9,9% ($P \leq 0,05$) na média de peso no tempo 14DPI, e encontramos significância na comparação entre 7DPI (\bar{x} =16,8g) e 14DPI (\bar{x} =18,7g), com um aumento de 11,3% ($P \leq 0,01$) na média de peso no tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 4C) não apresentou significância nos tempos -1TAI (\bar{x} =16,9g) e 7DPI (\bar{x} =16,6g), ocorrendo diminuição de 1,7% na média de peso no tempo 7DPI, mas houve significância na comparação dos tempos -1TAI (\bar{x} =16,9g) e 14DPI (\bar{x} =18,6g), havendo aumento de 10,0% ($P \leq 0,001$) na média de peso no tempo 14DPI, na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =16,6g) e 14DPI (\bar{x} =18,6g), encontramos significância e aumento de 12,0% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 14DPI.

A análise comparativa dos grupos AC e G1000 (Gráfico 4C), em acordo com os tempos de análise, não apresentou diferenças significativas, mas encontramos diferenças entre as médias de peso no tempo -1TAI (AC \bar{x} =17g; G1000 \bar{x} =16,9g) com diminuição de 0,5% na média de peso do grupo G1000, no tempo 7DPI (AC \bar{x} =16,8g; G1000 \bar{x} =16,6g) com diminuição de 1,1% na média de peso do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =18,7g; G1000 \bar{x} =18,6g) com diminuição de 0,5% na média de peso do grupo G1000.

As análises dos grupos AC e G1000, animais eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 4D), apresentou no grupo AC, uma não significância nos tempos

-1TAI (\bar{x} =17,2g) e 7DPI (\bar{x} =17,2g) e sem alteração na média de peso. Encontramos significância nos tempos -1TAI (\bar{x} =17,2g) e 42DPI (\bar{x} =20,6g), com aumento de 19,7% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI, e encontramos significância na comparação entre 7DPI (\bar{x} =17,2g) e 42DPI (\bar{x} =20,6g), com aumento de 19,7% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 4D), não apresentou significância nos tempos -1TAI (\bar{x} =16,1g) e 7DPI (\bar{x} =15,6g), ocorrendo diminuição de 3,1% na média de peso no tempo 7DPI. Encontramos significância entre os tempos -1TAI (\bar{x} =16,1g) e 42DPI (\bar{x} =20,8g), com aumento de 29,1% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI, e encontramos significância na comparação entre 7DPI (\bar{x} =15,6g) e 42DPI (\bar{x} =20,8g), com aumento de 33,3% ($P \leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI.

A análise comparativa dos grupos AC e G1000 (Gráfico 4D), em acordo com os tempos de análise, não apresentaram significância entre as médias no tempo -1TAI (AC \bar{x} =17,2g; G1000 \bar{x} =16,1g), com diminuição de 6,3% na média de peso do grupo G1000.

No tempo 7DPI (AC \bar{x} =17,2g; G1000 \bar{x} =15,6g) encontramos significância entre os grupos e uma diminuição de 9,3% ($P \leq 0,05$) na média de peso do grupo G1000, já no tempo 42DPI (AC \bar{x} =20,6g; G1000 \bar{x} =20,8g), não houve significância e uma diminuição de 0,9% na média de peso do grupo G1000.

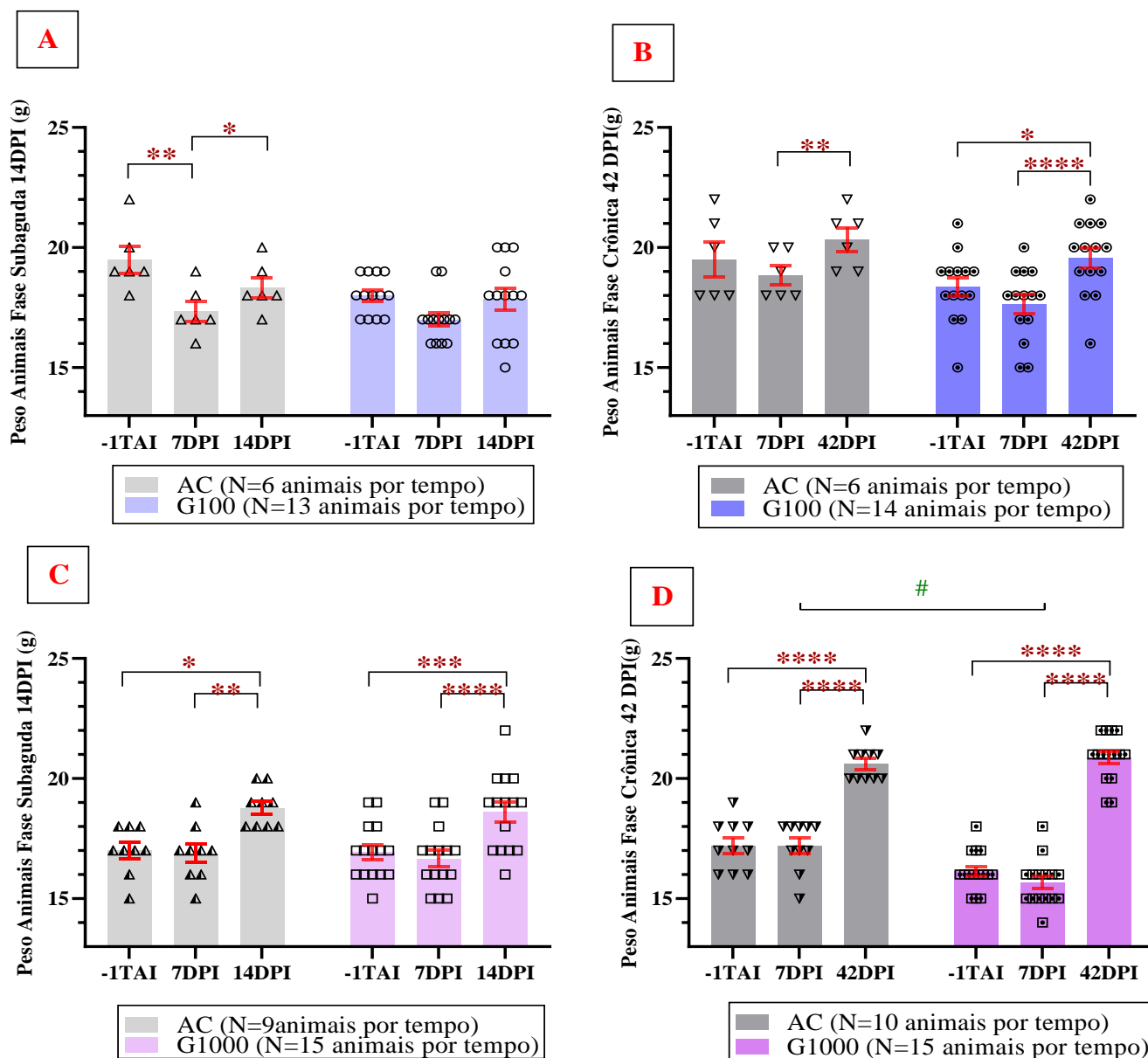


Gráfico 4: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis* e animais controle sem infecção, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Peso dos animais G100 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Peso dos animais G100 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Peso dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Peso dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção, já Onde $\#P \leq 0,05$, $##P \leq 0,01$, $###P \leq 0,001$ e $####P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e seus respectivos grupos de infecção G100 e G1000.

5.3. Identificação do impacto psicobiológico da infecção por meio de testes

comportamentais aplicados temporalmente nas fases aguda, subaguda e crônica da infecção

5.3.1. Neofagia

O teste de Neofagia auxiliou na análise dos efeitos de inóculos distintos, de *T. canis*, 100 e 1.000 ovos larvados, no comportamento tipo ansioso dos animais infectados em comparação aos animais controle. Apresentamos os dados de comparação com um valor *P* significativo, além de demonstração da média (\bar{x}) dos grupos em gramas (g), microgramas (mg) e segundos (s). Os dados analisados foram o peso dos animais antes e após o jejum, a quantidade de ração ingerida durante o teste e o tempo de latência para a primeira alimentação. Tais análises auxiliaram no controle de variáveis independentes, quanto ao apetite para o comportamento alimentar desejado.

5.3.1.1. Comparação do peso dos animais nos tempos de análise da infecção antes do jejum e após o jejum para aplicação do teste de Neofagia

A análise da média de peso dos animais do grupo AC e G100 antes do jejum e após o jejum, animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 5), no grupo AC não apresentaram significância nas análises realizadas no tempo -1TAI (antes jejum \bar{x} =19,5g; após jejum \bar{x} =17,3g), mas ocorreu diminuição de 11,3% na média de peso após o jejum.

No tempo 7DPI (antes do jejum \bar{x} =17,3g; após o jejum \bar{x} =18,1g) não encontramos significância, mas ocorreu aumento de 4,6% na média de peso após o jejum; e no tempo 14DPI (antes do jejum \bar{x} =18,3g; após o jejum \bar{x} =18g) não encontramos significância, mas ocorreu diminuição de 1,6% da média de peso após o jejum.

O grupo G100 (Gráfico 5), apresentou diferenças significativas nas comparações da média de peso nos tempos -1TAI (antes jejum \bar{x} =18g; após jejum \bar{x} =16,6g), com diminuição de 7,7% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, 7DPI (antes do jejum \bar{x} =17g; após o jejum \bar{x} =18,4g), com aumento de 8,2% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, e 14DPI (antes do jejum \bar{x} =17,8g; após o jejum \bar{x} =17,3g), com diminuição de 2,8% na média de peso após o jejum.

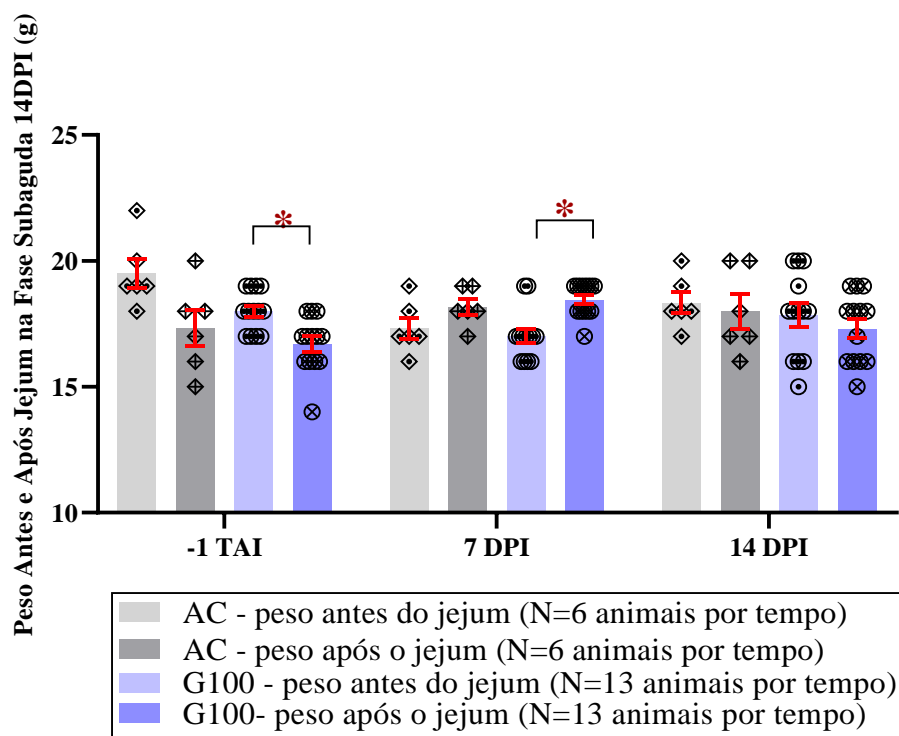


Gráfico 5: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI, nos momentos antes e após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100, peso médio antes e após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre o mesmo grupo antes e após o jejum.

A análise comparativa dos animais entre os tempos de análise da infecção (Gráfico 6) após o jejum, grupo AC, não apresentou diferenças significativas na média de peso dos animais após o jejum, mas encontramos diferenças entre as médias de peso ao compararmos o tempo -1TAI ($\bar{x}=17,3g$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=18,1g$), ocorrendo aumento de 4,6% na média de peso após o jejum no tempo 7DPI.

A comparação entre o tempo -1TAI ($\bar{x}=17,3g$) e 14DPI ($\bar{x}=18g$) apresentou um aumento de 4,0% na média de peso após o jejum no tempo 14DPI, e a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=18,1g$) e 14DPI ($\bar{x}=18g$) apresentou diminuição de 0,5% na média de peso após o jejum no tempo 14DPI.

Na análise do grupo G100 (Gráfico 6), encontramos diferenças entre a média de peso nos tempos -1TAI ($\bar{x}=16,6g$) e 7 DPI ($\bar{x}=18,4g$), com aumento de 10,8% na média de peso após o jejum no tempo 7DPI. Já na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=16,6g$)

e 14DPI (\bar{x} =17,3g) encontramos um aumento de 4,1% na média de peso após o jejum no tempo 14DPI, esses achados do grupo G100 não apresentaram significância.

A comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =18,4g) e 14DPI (\bar{x} =17,3g), do grupo G100, apresentou significância e diminuição de 5,9% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum no tempo 14DPI.

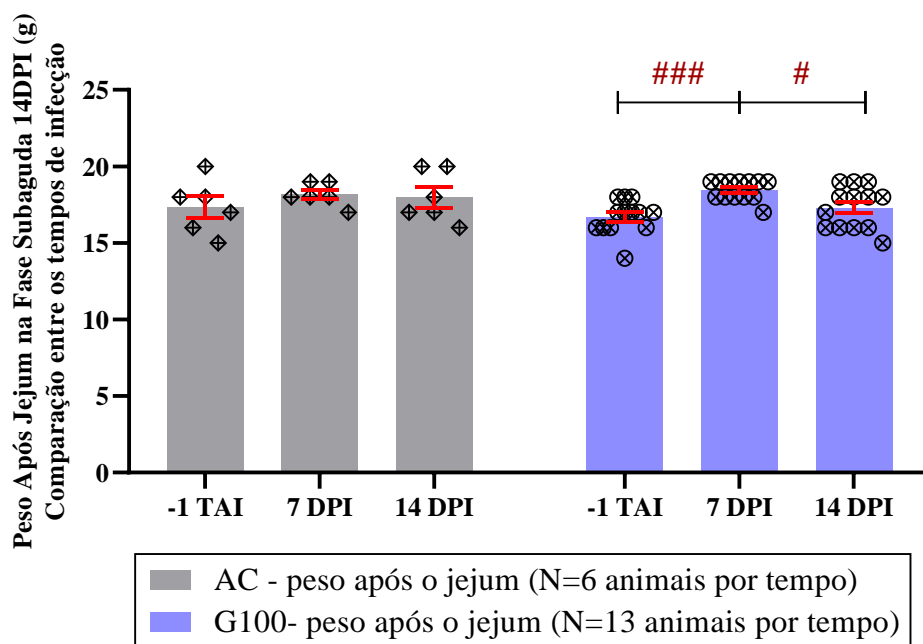


Gráfico 6: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100 comparação do peso médio após jejum entre os tempos de infecção.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ e #### $P \leq 0,0001$ indicam a comparação temporal do grupo após o jejum.

A análise comparativa temporal entre AC e G100 (Gráfico 7) não apresentou significância, mas encontramos no tempo -1TAI (AC \bar{x} =17,3g; G100 \bar{x} =16,6g) uma diminuição de 4,0% na média de peso do grupo G100, enquanto que, no tempo 7DPI (AC \bar{x} =18,1g; G100 \bar{x} =18,4g) encontramos um aumento de 1,6% na média de peso do grupo G100, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =18g; G100 \bar{x} =17,3g) encontramos uma diminuição de 3,8% na média de peso do grupo G100.

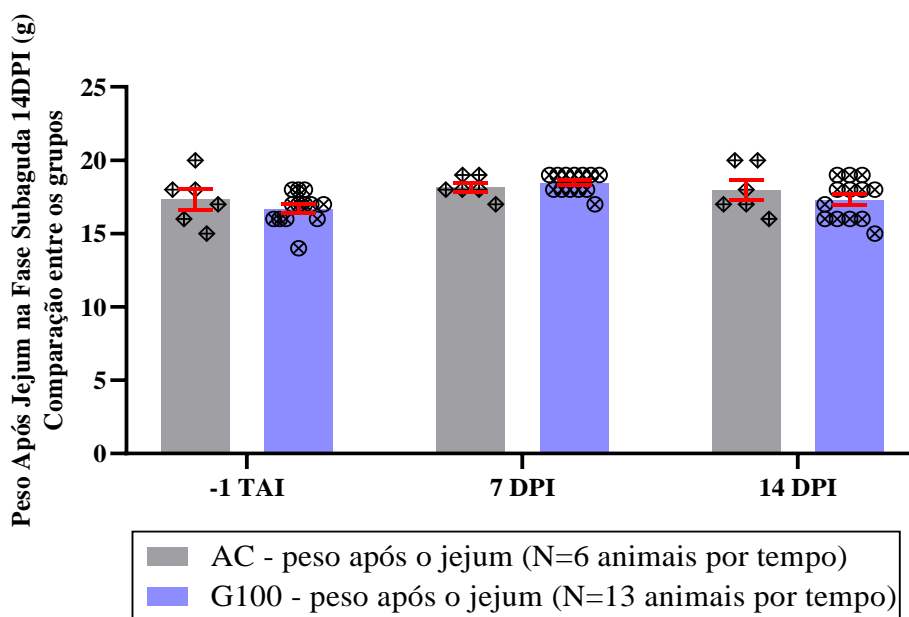


Gráfico 7: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100, comparação entre os tempos de análise da média de peso após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni.

A análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 8), apresentou os seguintes resultados. O grupo AC, no tempo -1TAI (antes do jejum \bar{x} =19,5g; após o jejum \bar{x} =18,1g), apresentou diminuição de 7,1% na média de peso após o jejum, e não encontramos significância entre os momentos, enquanto que, encontramos significância no tempo 7 DPI (antes do jejum \bar{x} =18,8g; após o jejum \bar{x} =21g) com aumento de 11,7% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, e no tempo 42 DPI (antes do jejum \bar{x} =20,3g; após o jejum \bar{x} =19,6g), não encontramos significância, mas ocorreu diminuição de 3,4% na média de peso após o jejum.

O grupo G100 (Gráfico 8), não apresentou significância nas análises, mas encontramos diferenças entre as médias de peso no tempo -1TAI (antes do jejum \bar{x} =18,3g; após o jejum \bar{x} =16,8g), com diminuição de 8,1% na média de peso após o jejum, no tempo 7DPI (antes do jejum \bar{x} =17,6g; após o jejum \bar{x} =18,7g) encontramos aumento na média de peso de 6,2% após o jejum, e no tempo 42DPI (antes do jejum \bar{x} =19,5g; após o jejum \bar{x} =18,7g) ocorreu diminuição na média de peso de 4,1% após o jejum.

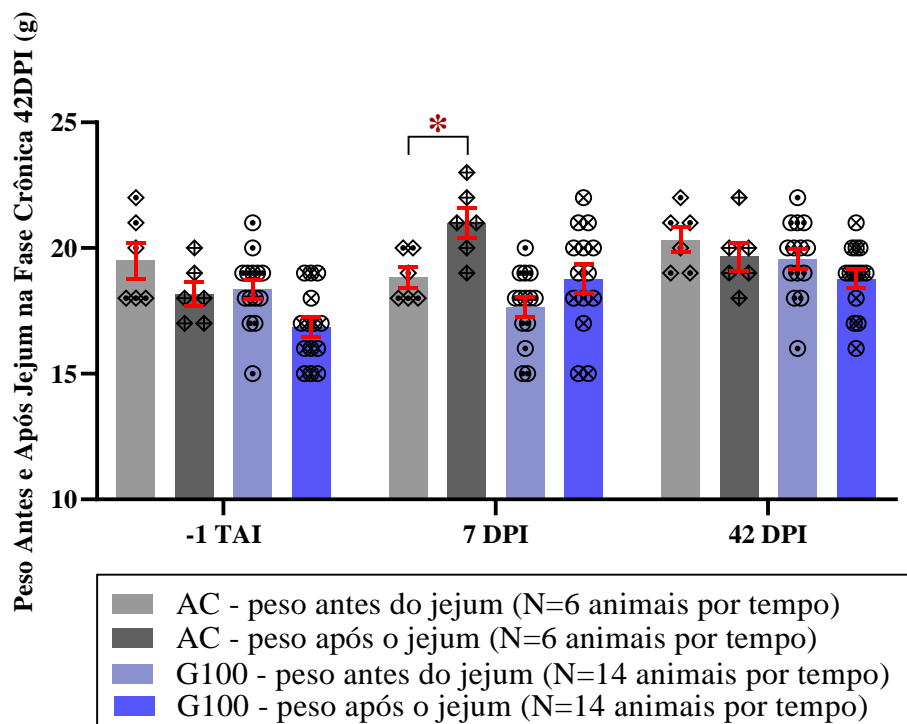


Gráfico 8: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI antes e após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100, peso médio antes e após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre o mesmo grupo antes e após o jejum.

A análise comparativa da média de peso após o jejum dos animais entre os tempos de análise da infecção (Gráfico 9), apresentou significância no grupo AC, na comparação dos tempos -1TAI ($\bar{x}=18,1\text{g}$) e 7DPI ($\bar{x}=21\text{g}$), ocorrendo aumento de 16,0% ($P \leq 0,01$) na média de peso após o jejum no tempo 7DPI, e na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=18,1\text{g}$) e 42DPI ($\bar{x}=19,6\text{g}$), no qual encontramos um aumento de 8,2% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum no tempo 42DPI.

Já a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=21\text{g}$) e 42DPI ($\bar{x}=19,6\text{g}$), não apresentou diferenças significativas, mas ocorreu diminuição de 6,6% na média de peso dos animais no tempo 42DPI após o jejum.

O grupo G100 (Gráfico 9), apresentou significância na comparação do tempo -1TAI ($\bar{x}=16,8\text{g}$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=18,7\text{g}$), com aumento de 11,3% ($P \leq 0,05$) na média de peso no tempo 7DPI, e na análise dos tempos -1TAI ($\bar{x}=16,8\text{g}$) e 42DPI

(\bar{x} =18,7g), com um aumento de 11,3% ($P \leq 0,001$) na média de peso no tempo 42DPI após o jejum.

Já a comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =18,7g) e 42DPI (\bar{x} =18,7g), não apresentou significância e nem diferença entre as médias de peso dos animais após o jejum.

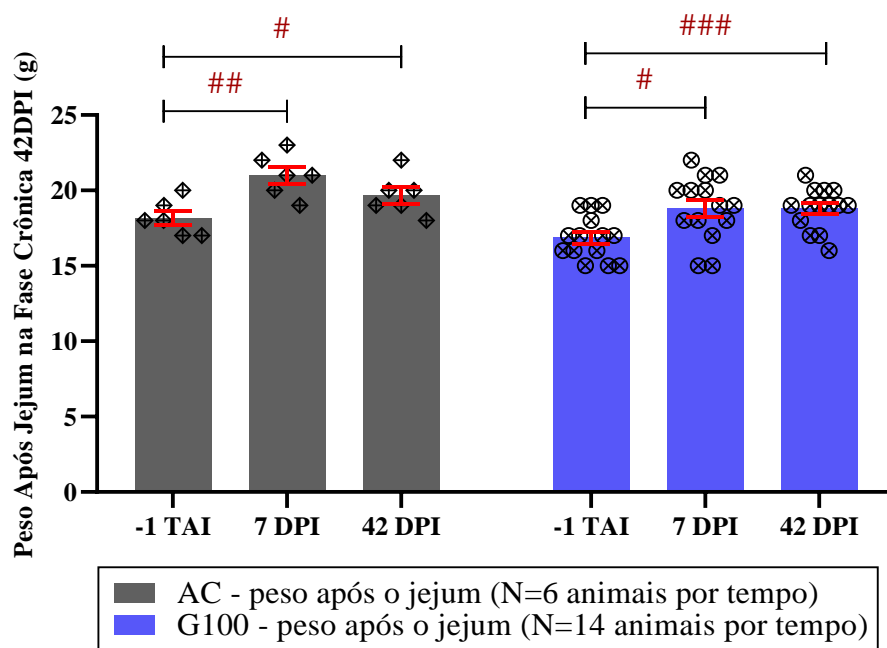


Gráfico 9: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100 comparação do peso médio após jejum entre os tempos de infecção. Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ e #### $P \leq 0,0001$ indicam a comparação temporal do grupo após o jejum.

A análise comparativa temporal entre AC e G100 (Gráfico 10) não apresentou significância no tempo -1TAI (AC \bar{x} =18,1g; G100 \bar{x} =16,8g) com ocorrência de diminuição de 7,1% na média de peso do grupo G100.

Mas, no tempo 7DPI (AC \bar{x} =21g; G100 \bar{x} =18,7g) encontramos significância e um aumento de 10,9% ($P \leq 0,05$) na média de peso do grupo G100, enquanto o tempo 14DPI (AC \bar{x} =19,6g; G100 \bar{x} =18,7g) não houve significância, mas ocorreu diminuição de 4,5% na média de peso do grupo G100.

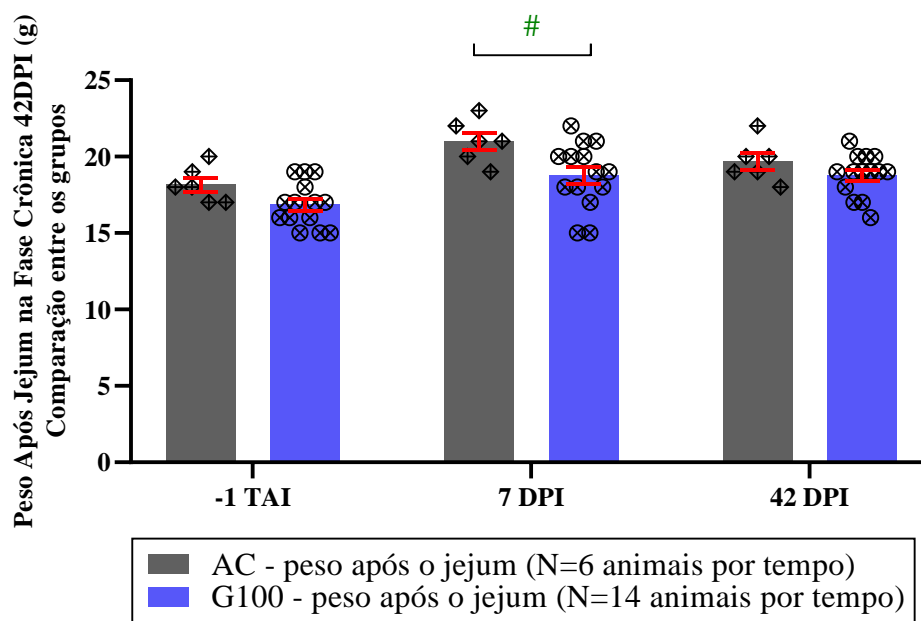


Gráfico 10: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 100 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42 DPI após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100, comparação entre os tempos de análise da média de peso após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ e #### $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e G100.

A análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G1000, antes do jejum e após o jejum, animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 11), no grupo AC, não apresentou significância nas análises realizadas nos tempos -1TAI (antes jejum $\bar{x}=17g$; após jejum $\bar{x}=16,2g$), mas ocorreu diminuição de 4,7% na média de peso após o jejum, e no tempo 7DPI (antes do jejum $\bar{x}=17,3g$; após o jejum $\bar{x}=18,1g$), no qual ocorreu aumento de 2,3% na média de peso após o jejum.

O tempo 14DPI (antes do jejum $\bar{x}=18,7g$; após o jejum $\bar{x}=16,8g$) apresentou significância e diminuição de 10,0% ($P \leq 0,01$) da média de peso após o jejum.

O grupo G1000 (Gráfico 11), apresentou diferenças significativas nas comparações da média de peso nos tempos -1TAI (antes jejum $\bar{x}=16,9g$; após jejum $\bar{x}=15,6g$), com diminuição de 7,6% ($P \leq 0,001$) na média de peso após o jejum, 7DPI (antes do jejum $\bar{x}=16,6g$; após o jejum $\bar{x}=15,6g$), com aumento de 6,0% ($P \leq 0,001$) na média de peso após o jejum, e 14DPI (antes do jejum $\bar{x}=18,6g$; após o jejum $\bar{x}=17,3g$), com diminuição de 6,9% ($P \leq 0,001$) na média de peso após o jejum.

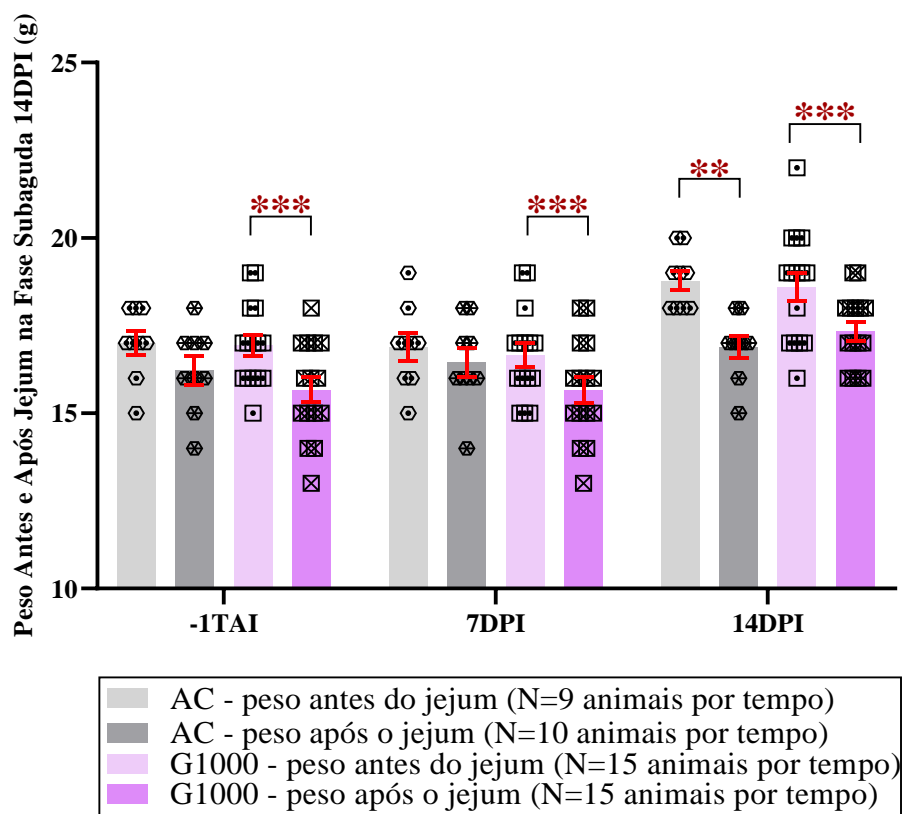


Gráfico 11: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI nos momentos antes e após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G1000, peso médio antes e após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre o mesmo grupo antes e após o jejum.

A análise comparativa dos animais entre os tempos de análise da infecção (Gráfico 12) após o jejum, grupo AC, não apresentou diferenças significativas na média de peso dos animais após o jejum, mas encontramos diferenças entre as médias de peso ao compararmos o tempo -1TAI ($\bar{x}=16,2g$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=18,1g$), ocorrendo aumento de 11,7% na média de peso após o jejum no tempo 7DPI.

A comparação entre o tempo -1TAI ($\bar{x}=16,2g$) e 14DPI ($\bar{x}=16,8g$) apresentou um aumento de 3,7% na média de peso após o jejum no tempo 14DPI, e a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=18,1g$) e 14DPI ($\bar{x}=16,8g$) apresentou diminuição de 7,1% na média de peso após o jejum no tempo 14DPI.

Na análise do grupo G1000 (Gráfico 12), não encontramos significância e diferenças entre as médias de peso dos tempos -1TAI ($\bar{x}=15,6g$) e 7 DPI ($\bar{x}=15,6g$), enquanto que, na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=15,6g$) e 14DPI ($\bar{x}=17,3g$)

encontramos significância e um aumento de 10,8% ($P \leq 0,0001$) na média de peso após o jejum no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=15,6\text{g}$) e 14DPI ($\bar{x}=17,3\text{g}$) encontramos significância e aumento de 10,8% ($P \leq 0,0001$) na média de peso após o jejum no tempo 14DPI.

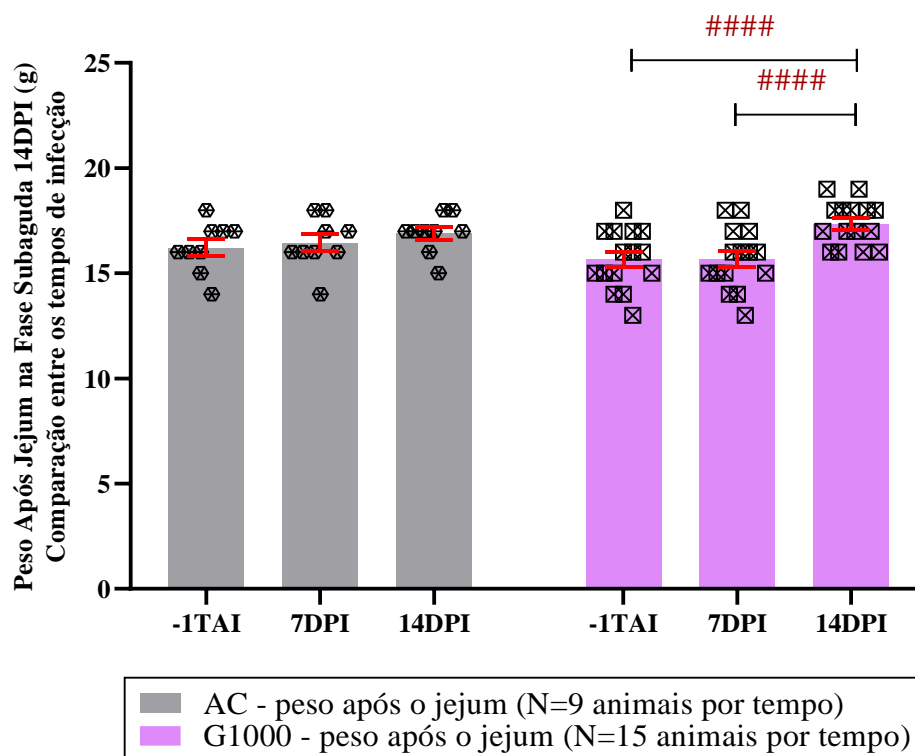


Gráfico 12: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G1000 comparação do peso médio após jejum entre os tempos de infecção.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ e #### $P \leq 0,0001$ indicam a comparação temporal do grupo após o jejum.

A análise comparativa temporal entre AC e G1000 (Gráfico 13) não apresentou significância, mas encontramos no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=16,2\text{g}$; G1000 $\bar{x}=15,6\text{g}$) uma diminuição de 3,7% na média de peso do grupo G1000.

No tempo 7DPI (AC $\bar{x}=16,4\text{g}$; G1000 $\bar{x}=15,6\text{g}$) encontramos diminuição de 4,8% na média de peso do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC $\bar{x}=16,8\text{g}$; G1000 $\bar{x}=17,3\text{g}$) encontramos um aumento de 2,9% na média de peso do grupo G1000.

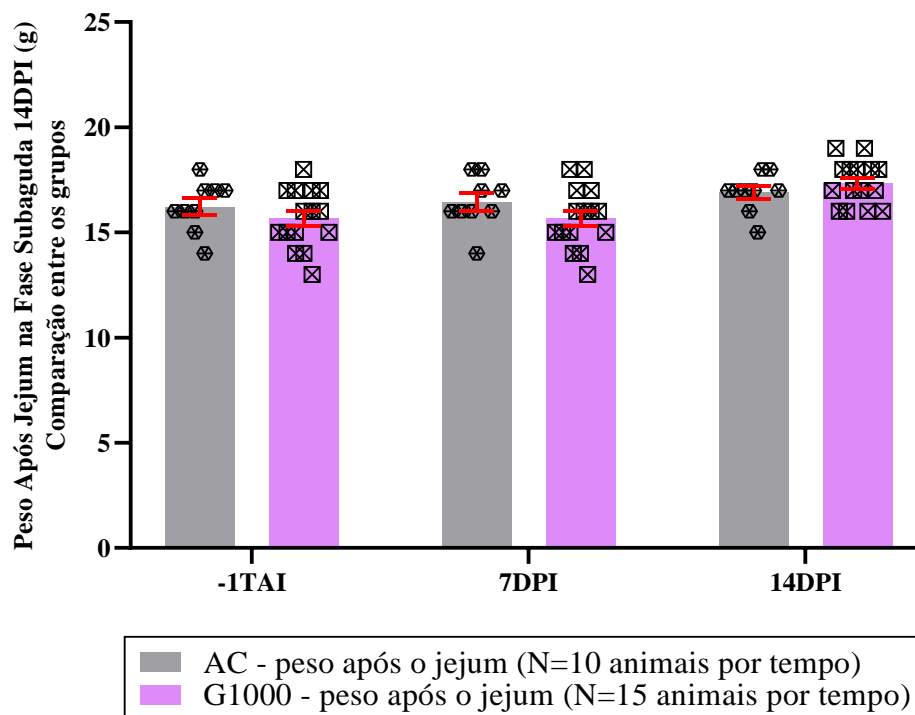


Gráfico 13: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase subaguda da infecção 14 DPI após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G1000, comparação entre os tempos de análise da média de peso após jejum. Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni.

A análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G1000, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 14), apresentou significância quanto a média de peso antes e após o jejum.

O grupo AC nos tempos -1TAI (antes do jejum \bar{x} =17,2g; após o jejum \bar{x} =16g), apresentou diminuição de 6,9% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, no tempo 7DPI (antes do jejum \bar{x} =17,2g; após o jejum \bar{x} =15,9g), com diminuição de 7,5% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, e no tempo 42DPI (antes do jejum \bar{x} =20,6g; após o jejum \bar{x} =19g) com uma diminuição de 7,7% ($P \leq 0,01$) na média de peso dos animais após o jejum.

A análise do grupo G1000 (Gráfico 14), apresentou significância na média de peso antes e após o jejum, nos tempos -1TAI (antes do jejum \bar{x} =15,4g; após o jejum \bar{x} =16,1g), com diminuição de 4,5% ($P \leq 0,05$) na média de peso após o jejum, no tempo 7DPI (antes do jejum \bar{x} =15,6g; após o jejum \bar{x} =14,8g), com diminuição de 5,1% ($P \leq 0,0001$) na média

de peso após o jejum, e no tempo 42DPI (antes do jejum $\bar{x}=20,8\text{g}$; após o jejum $\bar{x}=18,9\text{g}$), com diminuição na média de peso dos animais de 9,1% ($P\leq 0,0001$) após o jejum.

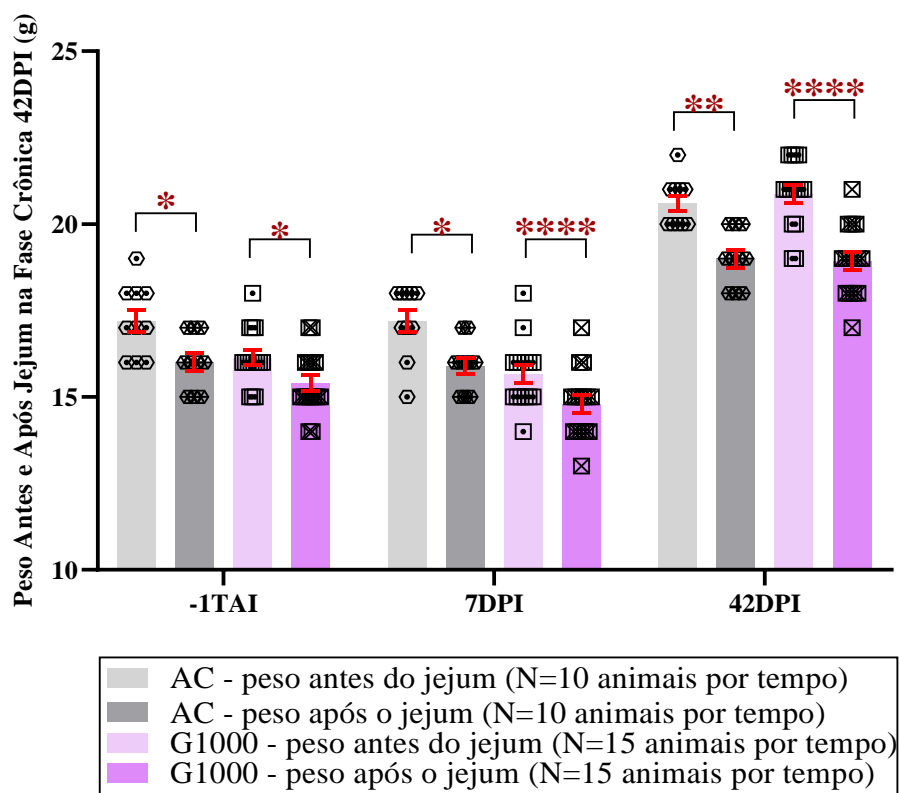


Gráfico 14: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI antes e após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G100, peso médio antes e após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde * $P\leq 0,05$, ** $P\leq 0,01$, *** $P\leq 0,001$ e **** $P\leq 0,0001$ indicam a comparação entre o mesmo grupo antes e após o jejum.

A análise comparativa da média de peso após o jejum dos animais entre os tempos de análise da infecção (Gráfico 15), não apresentou significância no grupo AC, na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=16\text{g}$) e 7DPI ($\bar{x}=15,9\text{g}$), mas houve uma diminuição de 0,6% na média de peso dos animais no tempo 7DPI após o jejum.

Já a análise comparativa do tempo -1TAI ($\bar{x}=16\text{g}$) com o tempo 42DPI ($\bar{x}=19\text{g}$), apresentou significância e um aumento de 18,7% ($P\leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI após o jejum. E na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=15,9\text{g}$) e o tempo 42DPI ($\bar{x}=19\text{g}$), encontramos significância e um aumento de 19,4% ($P\leq 0,0001$) na média de peso dos animais após o jejum no tempo 42DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 15), apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=15,4g$) e 7 DPI ($\bar{x}=14,8g$), uma diminuição de 3,8% ($P\leq 0,05$) na média de peso após o jejum no tempo 7DPI, na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=15,4g$) e 42 DPI ($\bar{x}=18,9g$) encontramos significância e um aumento de 22,7% ($P\leq 0,0001$) na média de peso após o jejum no tempo 42DPI, enquanto que a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=14,8g$) e 42 DPI ($\bar{x}=18,9g$) apresentou significância e um aumento de 18,9% ($P\leq 0,0001$) na média de peso no tempo 42DPI.

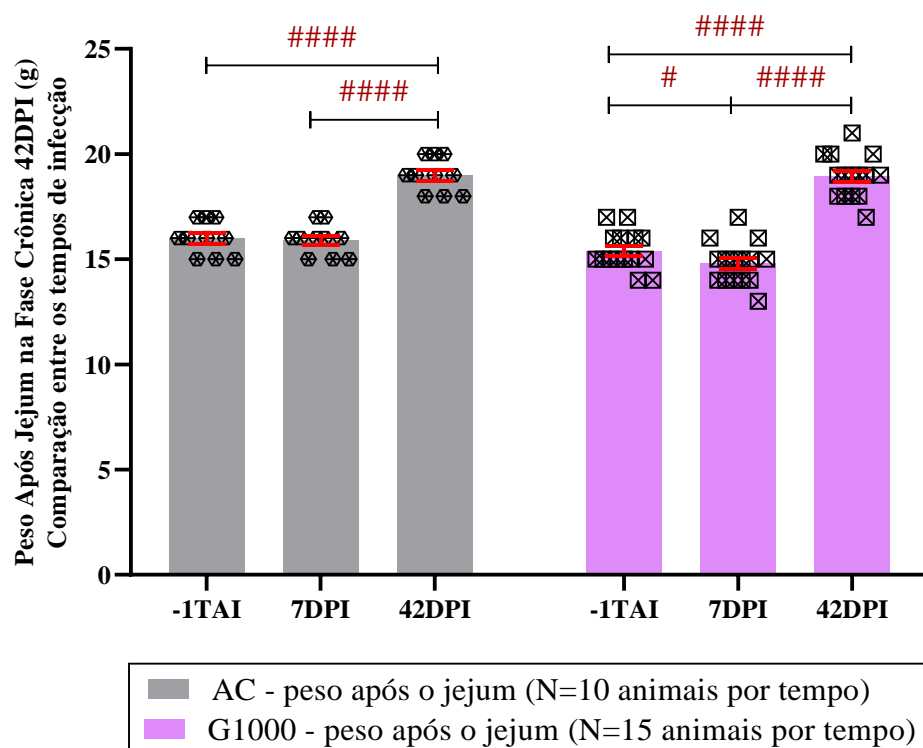


Gráfico 15: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI e fase crônica da infecção 42DPI dos grupos após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G1000 comparação do peso médio após jejum entre os tempos de infecção. Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P\leq 0,05$, ## $P\leq 0,01$, ### $P\leq 0,001$ e #### $P\leq 0,0001$ indicam a comparação temporal do grupo após o jejum.

A análise comparativa temporal entre AC e G1000 (Gráfico 16) não apresentou significância no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=16g$; G1000 $\bar{x}=15,4g$) e uma diminuição de 3,7% na média de peso do grupo G1000, no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=15,9g$; G1000 $\bar{x}=14,8g$) encontramos significância e diminuição de 6,9% ($P\leq 0,05$) na média de peso do grupo

G1000, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =19g; G1000 \bar{x} =18,9g) não encontramos significância e diminuição de 0,5% na média de peso do grupo G1000.

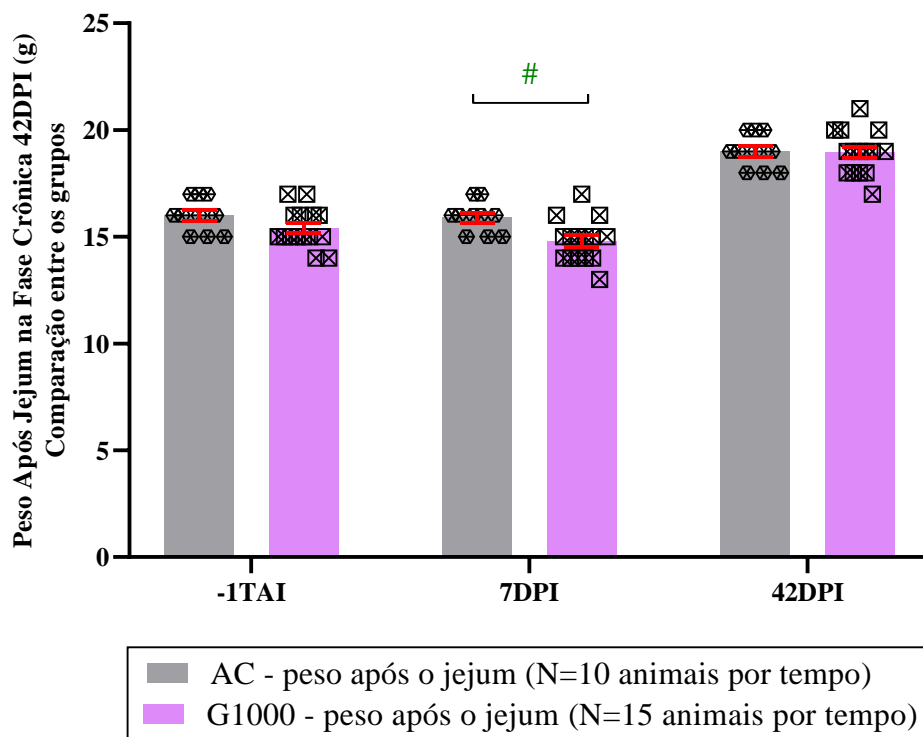


Gráfico 16: Peso dos camundongos BALB/c infectados com 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre os grupos nos tempos, antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, e fase crônica da infecção 42DPI após jejum para o teste de Neofagia. Peso dos animais AC e G1000, comparação entre os tempos de análise da média de peso após jejum.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde # $P \leq 0,05$, ## $P \leq 0,01$, ### $P \leq 0,001$ e #### $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e G1000.

5.3.1.2. Quantidade de ração ingerida durante o teste de Neofagia

A ração disponível para os animais foi pesada antes do teste e após a realização do teste, levando ao peso médio de ração ingerida por grupo, em miligramas, em cada tempo de análise da infecção.

Na análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 14DPI (Gráfico 17A), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC apresentou no tempo -1TAI (\bar{x} =199,5mg) em comparação ao tempo 7DPI (\bar{x} =234,6mg), um aumento de 17,6% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, mas não ocorreu significância no tempo -1TAI (\bar{x} =199,5mg) em comparação ao tempo 14DPI (\bar{x} =352,5mg) onde encontramos significância e um aumento de 76,6%

($P \leq 0,01$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI. A comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=234,6\text{mg}$) e 14DPI ($\bar{x}=352,5\text{mg}$), apresentou significância e um aumento de 50,2% ($P \leq 0,05$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI.

O grupo G100 (Gráfico 17A), apresentou um peso médio de ração ingerida significativo na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=138,0\text{mg}$) e 14DPI ($\bar{x}=305,2\text{mg}$), com um aumento de 121,1% ($P \leq 0,01$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI. A comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=138,0\text{mg}$) e 7DPI ($\bar{x}=238,1\text{mg}$), não apresentou significância e um aumento de 72,5% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, e a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=238,1\text{mg}$) e 14DPI ($\bar{x}=305,2\text{mg}$), não apresentou significância e um aumento de 28,1% no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI.

A análise comparativa temporal entre AC e G100 (Gráfico 17A) não apresentou significância, mas encontramos no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=199,5\text{mg}$; G100 $\bar{x}=138,0\text{mg}$) uma diminuição de 30% no peso médio de ração ingerida do grupo G100, no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=234,6\text{mg}$; G100 $\bar{x}=238,1\text{mg}$) encontramos um aumento de 1,4% no peso médio de ração ingerida do grupo G100. No tempo 14DPI (AC $\bar{x}=352,5\text{mg}$; G100 $\bar{x}=305,2\text{mg}$) encontramos uma diminuição de 13,4% no peso médio de ração ingerida do grupo G100.

Na análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 17B), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC não apresentou significância em nenhuma das comparações, mas encontramos na comparação do tempo -1TAI ($\bar{x}=175,3\text{mg}$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=250,8\text{mg}$), um aumento de 43,1% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=250,8\text{mg}$) e 42DPI ($\bar{x}=246\text{mg}$) encontramos uma diminuição de 40,3% no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI, e a comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=250,8\text{mg}$) e 42DPI ($\bar{x}=246\text{mg}$), apresentou uma diminuição de 2,0% no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI.

O grupo G100 (Gráfico 17B), na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=169,7\text{mg}$) e 7DPI ($\bar{x}=273,7\text{mg}$) não apresentou significância e um aumento de 61,2% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=169,7\text{mg}$) e 42DPI ($\bar{x}=338,9\text{mg}$), encontramos significância e um aumento de 99,7% ($P \leq 0,01$) no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI. Já na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=273,7\text{mg}$) e 42DPI ($\bar{x}=338,9\text{mg}$), não encontramos significância e um aumento de 19,2% no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI, e tais achados não apresentaram relevância estatística.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G100 (Gráfico 17B) não apresentou significância, mas encontramos no tempo -1TAI (AC \bar{x} =175,3mg; G100 \bar{x} =169,7mg) uma diminuição de 3,1% no peso médio de ração ingerida do grupo G100. No tempo 7DPI (AC \bar{x} =250,8mg; G100 \bar{x} =273,7mg) não encontramos significância e um aumento de 9,1% no peso médio de ração ingerida do grupo G100, e no tempo 42DPI (AC \bar{x} =246mg; G100 \bar{x} =338,9mg) não encontramos significância e uma diminuição de 37,7% no peso médio de ração ingerida do grupo G100.

Na análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G1000, eutanasiados na fase crônica da infecção 14DPI (Gráfico 17C), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC não apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =92,8mg) e 7DPI (\bar{x} =187,3mg), mas ocorreu um aumento de 101,8% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI. As análises comparativas entre os tempos -1TAI (\bar{x} =92,8mg) e 14DPI (\bar{x} =432,1mg) apresentou significância e um aumento de 365,6% ($P \leq 0,0001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI, enquanto a comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =187,3mg) e 14DPI (\bar{x} =432,1mg), apresentou significância e um aumento de 130,6% ($P \leq 0,0001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 17C), apresentou um peso médio de ração ingerida significativo na comparação entre os tempos, -1TAI (\bar{x} =110,0mg) e 7DPI (\bar{x} =203,2mg), com um aumento de 84,7% ($P \leq 0,05$) no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, -1TAI (\bar{x} =110,0mg) e 14DPI (\bar{x} =360,2mg), com aumento de 227,4% ($P \leq 0,0001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI, e 7DPI (\bar{x} =203,2mg) e 14DPI (\bar{x} =360,2mg), com aumento de 77,2% ($P \leq 0,0001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 14DPI.

A análise comparativa temporal entre AC e G1000 (Gráfico 17C) não apresentou significância, mas encontramos no tempo -1TAI (AC \bar{x} =92mg; G1000 \bar{x} =110,0mg) um aumento de 19,5% no peso médio de ração ingerida do grupo G1000. No tempo 7DPI (AC \bar{x} =187,3mg; G1000 \bar{x} =203,2mg) ocorreu um aumento de 8,4% no peso médio de ração ingerida do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =432,1mg; G1000 \bar{x} =360,2mg) uma diminuição de 16,6% no peso médio de ração ingerida do grupo G1000.

Na análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G1000, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 17D), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC apresentou significância nas comparações do tempo -1TAI (\bar{x} =103,6mg) com o tempo 7DPI (\bar{x} =247,1mg), ocorrendo aumento de 138,5% ($P \leq 0,01$) no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, na comparação entre os tempos -1TAI

(\bar{x} =103,68mg) e 42DPI (\bar{x} =268,7mg) encontramos significância e um aumento de 159,3% ($P \leq 0,001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI. A comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =247,1mg) e 42DPI (\bar{x} =268,7mg), apresentou um aumento de 8,7% no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI, mas não houve relevância estatística na comparação entre esses tempos.

As comparações do grupo G1000 (Gráfico 17D), entre os tempos -1TAI (\bar{x} =151,2mg) e 7DPI (\bar{x} =226,8mg) não apresentou significância e um aumento de 50,0% no peso médio de ração ingerida no tempo 7DPI, enquanto que, na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =151,2mg) e 42DPI (\bar{x} =103,6mg), encontramos significância e uma diminuição de 31,4% ($P \leq 0,001$) no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =226,8mg) e 42DPI (\bar{x} =103,6mg), não encontramos significância e uma diminuição de 54,3% no peso médio de ração ingerida no tempo 42DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G1000 (Gráfico 17D) não apresentou relevância estatística, nos tempos de análise -1TAI (AC \bar{x} =103,6mg; G1000 \bar{x} =151,2mg), ocorrendo um aumento de 45,9% no peso médio de ração ingerida do grupo G1000, e no tempo 7DPI (AC \bar{x} =247,1mg; G1000 \bar{x} =226,8mg) encontramos uma diminuição de 8,2% no peso médio de ração ingerida do grupo G1000. Já o tempo 42DPI (AC \bar{x} =103,6mg; G1000 \bar{x} =103,6mg) apresentou significância entre os grupos ($P \leq 0,001$), mas não encontramos diferenças entre os pesos médios de ração ingerida pelos grupos.

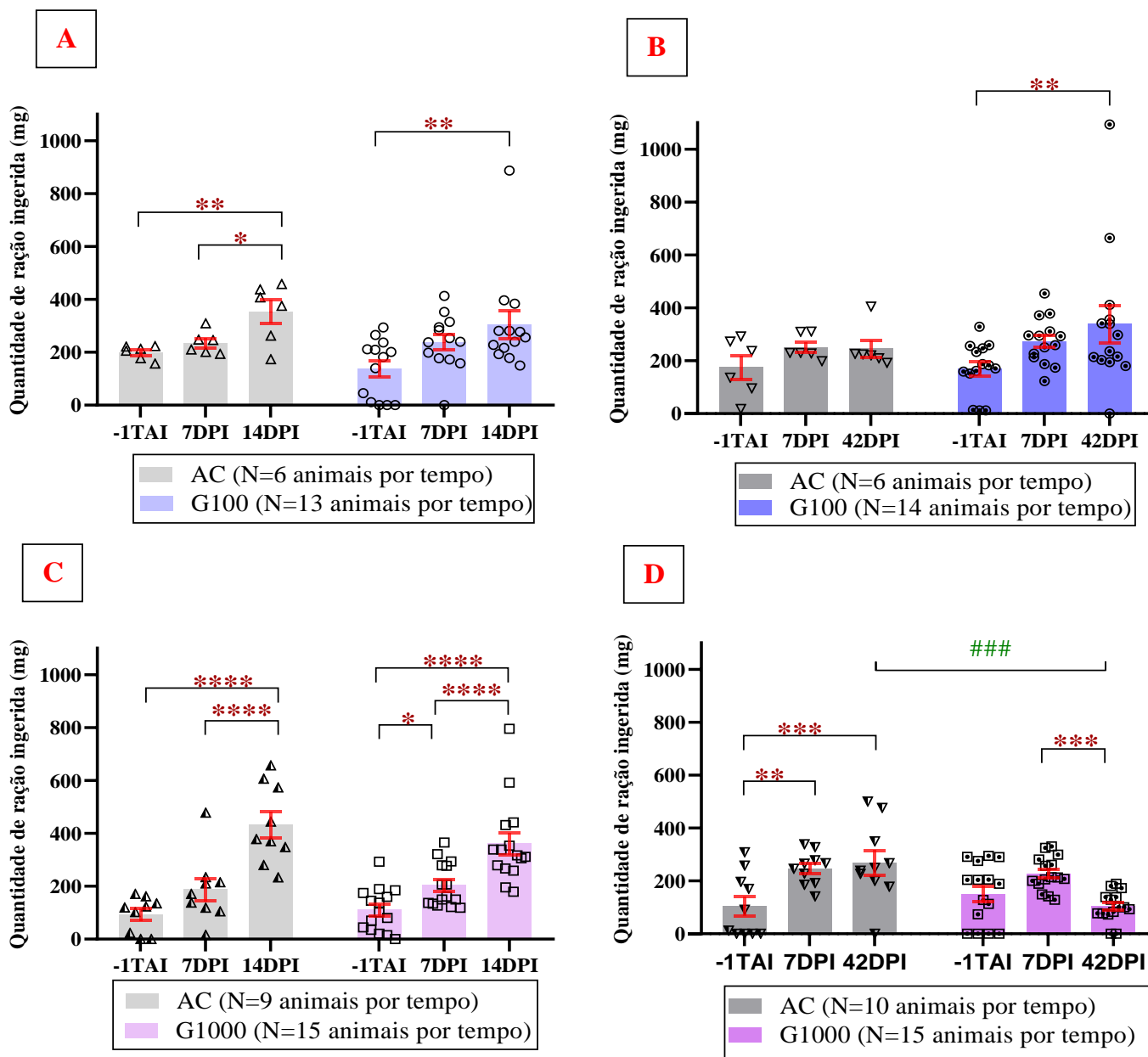


Gráfico 17: Quantidade de ração ingerida durante o teste de Neofagia pelos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Peso médio de ração ingerida pelos grupos AC e G100 eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Peso médio de ração ingerida pelos grupos AC e G100 eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Peso médio da ração ingerida pelos grupos AC e G1000 eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Peso médio da ração ingerida pelos grupos AC e G1000 eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção, já $\#P \leq 0,05$, $\###P \leq 0,01$, $\####P \leq 0,001$ e $\#####P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e seus respectivos grupos de infecção G100 e G1000.

5.3.1.3. Tempo de latência para a primeira alimentação durante o teste de Neofagia

O tempo de latência para a primeira ingestão da ração, após o jejum de 16 a 18 horas dos animais, foi considerado em segundos, analisando-se assim o tempo médio dos grupos.

Na análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 14DPI (Gráfico 18A), encontramos os seguintes resultados. O grupo AC não apresentou significância na comparação entre os tempos, mas encontramos na comparação do tempo -1TAI ($\bar{x}=269,1s$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=463,1s$), um aumento de 72,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI.

Nos tempos -1TAI ($\bar{x}=269,1s$) e 14DPI ($\bar{x}=259,8s$) encontramos uma diminuição de 3,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI, e os tempos 7DPI ($\bar{x}=463,1s$) e 14DPI ($\bar{x}=259,8s$) uma diminuição de 43,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI.

O grupo G100 (Gráfico 18A), apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=262,9s$) e 7DPI ($\bar{x}=633,7s$), com aumento de 141,0% ($P\leq 0,05$) no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI. Já a comparação entre o tempo 7DPI ($\bar{x}=633,7s$) e 14DPI ($\bar{x}=124,9s$) apresentou significância e uma diminuição de 80,2% ($P\leq 0,001$) no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI. A comparação entre os tempos de análise -1TAI ($\bar{x}=262,9s$) e 14DPI ($\bar{x}=124,9s$) não apresentou significância e uma diminuição de 52,4% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G100 (Gráfico 18A) não apresentou significância no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=269,1s$; G100 $\bar{x}=262,9s$), mas ocorreu um aumento de 2,3% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100. O tempo 7DPI (AC $\bar{x}=463,1s$; G100 $\bar{x}=633,7s$) não apresentou significância, mas ocorreu um aumento de 36,8% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100, e o tempo 14DPI (AC $\bar{x}=259,8s$; G100 $\bar{x}=124,9s$) apresentou significância e diminuição de 51,9% ($P\leq 0,001$), no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100.

A análise dos animais pertencentes aos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 18B), apresentaram os seguintes resultados.

No grupo AC, não encontramos significância na comparação entre os tempos, mas encontramos na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =721,3s) e 7DPI (\bar{x} =752s) um aumento de 4,2% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI, enquanto que, a comparação entre o tempo -1TAI (\bar{x} =721,3s) e 42DPI (\bar{x} =494,6s) ocorreu uma diminuição de 31,4% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI. Já a comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =752s) e 42DPI (\bar{x} =494,6s) apresentou uma diminuição de 34,2% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI.

O grupo G100 (Gráfico 18B), também não apresentou relevância estatística na comparação entre os tempos, mas encontramos na comparação do tempo -1TAI (\bar{x} =622,5s) e 7DPI (\bar{x} =394,5s) uma diminuição de 36,6% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI. Na comparação entre o tempo -1TAI (\bar{x} =622,5s) e 42DPI (\bar{x} =367,7s) encontramos uma diminuição de 40,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =394,5s) e 42DPI (\bar{x} =367,7s) encontramos diminuição de 6,7% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G100 (Gráfico 18B) não apresentou relevância estatística nos tempos de análise, mas houve diferenças no tempo médio de latência para a primeira alimentação nos tempos -1TAI (AC \bar{x} =721,3s; G100 \bar{x} =622,5s), com uma diminuição de 13,6% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100.

No tempo 7DPI (AC \bar{x} =752s; G100 \bar{x} =394,5s) encontramos uma diminuição de 47,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100, e no tempo 42DPI (AC \bar{x} =494,6s; G100 \bar{x} =367,7s) com diminuição de 25,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G100.

Os grupos G1000 e AC, animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 18C), não apresentaram relevância estatística nas comparações, mas encontramos diferenças no tempo médio de latência para a alimentação.

O grupo AC apresentou nas comparações com o tempo -1TAI (\bar{x} =491,5s) e tempo 7DPI (\bar{x} =316,6s), uma diminuição de 35,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI. Na comparação entre o tempo -1TAI (\bar{x} =491,5s) e 14DPI (\bar{x} =270s) encontramos uma diminuição de 45,0% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DP., Já na comparação entre os tempos 7DPI

(\bar{x} =316,6s) e 14DPI (\bar{x} =494,6s) encontramos uma diminuição de 14,7% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 18C), também não apresentou significância na comparação entre os tempos, mas encontramos na comparação dos tempos -1TAI (\bar{x} =319,7s) e 7DPI (\bar{x} =403,9s) um aumento de 26,3% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI.

Na comparação entre o tempo -1TAI (\bar{x} =319,7s) e 14DPI (\bar{x} =301,1s) encontramos uma diminuição de 5,8% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =403,9s) e 14DPI (\bar{x} =301,1s) encontramos uma diminuição de 25,4% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 14DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G1000 (Gráfico 18C) não apresentou significância nos tempos de análise, mas houve diferenças entre os grupos no tempo -1TAI (AC \bar{x} =491,5s; G1000 \bar{x} =319,7s), com diminuição de 34,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000. No tempo 7DPI (AC \bar{x} =316,6s; G1000 \bar{x} =403,9s) ocorreu aumento de 27,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =270s; G1000 \bar{x} =301,1s) com aumento de 11,5% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000.

Na fase crônica da infecção 42DPI, os grupos AC e G1000 (Gráfico 18D) não apresentaram significância nas comparações, mas encontramos diferenças no tempo médio de latência para a alimentação.

No grupo AC encontramos, na comparação do tempo -1TAI (\bar{x} =397,7s) com o tempo 7DPI (\bar{x} =388,4s), uma diminuição de 2,3% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI. Na comparação entre o tempo -1TAI (\bar{x} =397,7s) e 42DPI (\bar{x} =489,1s) encontramos um aumento de 22,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =388,4s) e 42DPI (\bar{x} =489,1s) encontramos um aumento de 25,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 18D), não apresentou relevância estatística na comparação entre os tempos, mas encontramos na comparação do tempo -1TAI (\bar{x} =484,4s) com o tempo 7DPI (\bar{x} =426,5s) uma diminuição de 11,9% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 7DPI. Na comparação entre o tempo -1TAI

(\bar{x} =484,4s) e 42DPI (\bar{x} =448,4s) encontramos uma diminuição de 7,4% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =426,5s) e 42DPI (\bar{x} =448,4s) encontramos uma diminuição de 5,1% no tempo médio de latência para a primeira alimentação no tempo 42DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G1000 (Gráfico 18D) não apresentou significância, nos tempos de análise, mas houve diferenças no tempo -1TAI (AC \bar{x} =397,7s; G1000 \bar{x} =484,4s), com um aumento de 21,8% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000, no tempo 7DPI (AC \bar{x} =388,4s; G1000 \bar{x} =426,5s), com aumento de 9,8% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000, e no tempo 42DPI (AC \bar{x} =489,1s; G1000 \bar{x} =448,4s) com diminuição de 8,3% no tempo médio de latência para a primeira alimentação do grupo G1000.

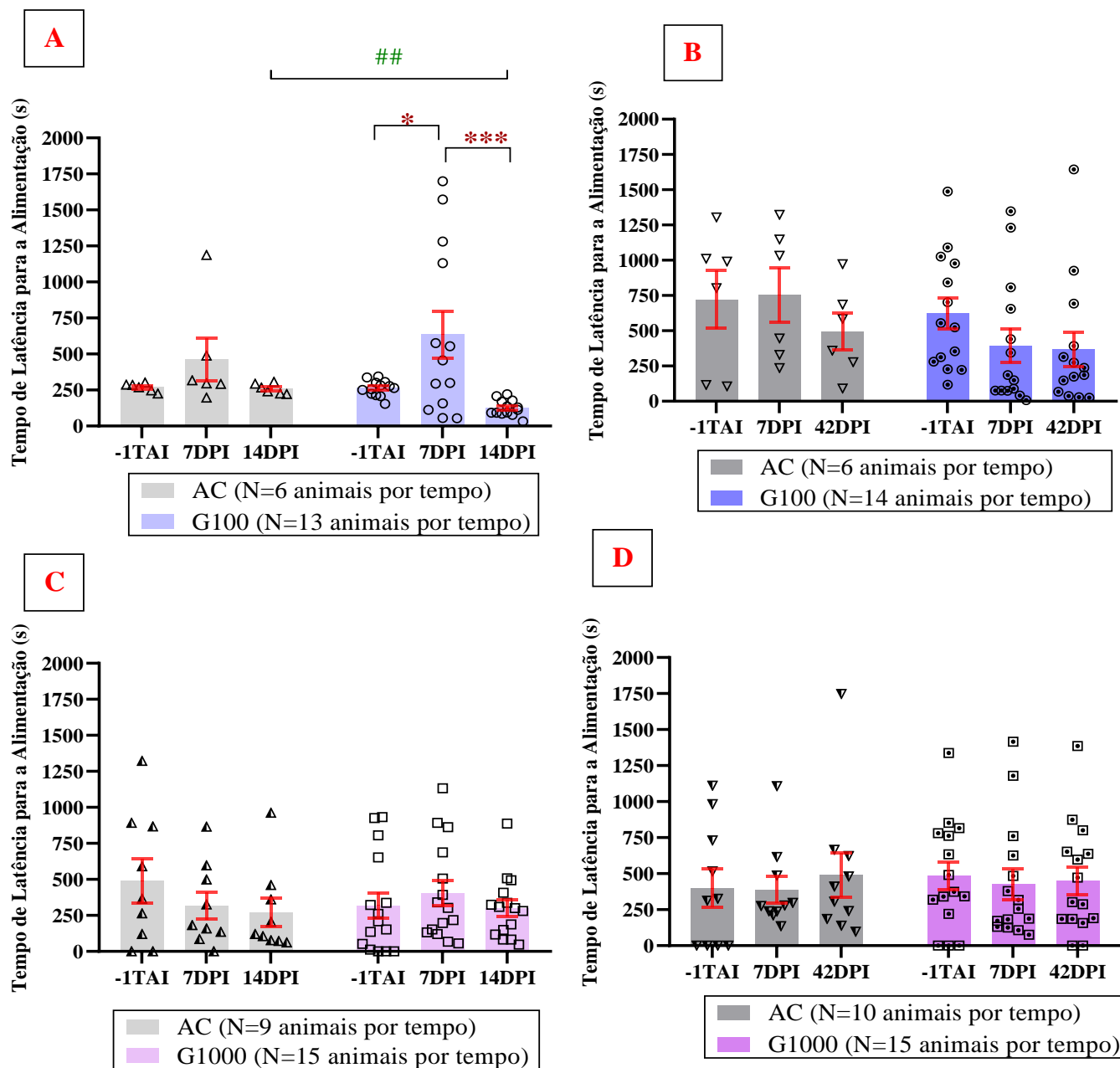


Gráfico 18: Tempo de latência para primeira alimentação analisados pelo teste de Neofagia em camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Latência para a primeira alimentação nos grupos AC e G100 eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Latência para a primeira alimentação nos grupos AC e G100 eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Latência para a primeira alimentação nos grupos AC e G1000 eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Latência para a primeira alimentação nos grupos AC e G1000 eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde $*P \leq 0,05$ e $**P \leq 0,001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção, já $\#P \leq 0,05$, $\#\#P \leq 0,01$, $\#\#\#P \leq 0,001$ e $\#\#\#\#P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e seus respectivos grupos de infecção G100 e G1000.

5.3.2. Teste do Nado Forçado

Os dados coletados com o teste do Nado Forçado são demonstrados comparativamente pelo valor P significativo, e pela média (\bar{x}) obtida pelos grupos em segundos (s).

5.3.2.1. Latência para o primeiro episódio de imobilidade após constância no nado durante o teste de Nado Forçado

A avaliação da latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 19A), grupos AC e G100, não gerou relevância estatística quando avaliamos cada grupo temporalmente, mas diferenças quanto a média da latência para o primeiro episódio de imobilidade foram encontradas entre os grupos e seus tempos.

Na comparação entre os tempos do grupo AC, encontramos nos tempos -1TAI ($\bar{x}=115,1s$) e 7DPI ($\bar{x}=109,1s$), uma diminuição de 5,2% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI, enquanto que, a comparação entre o tempo -1TAI ($\bar{x}=115,1s$) e o tempo 14DPI (119,5s) apresentou um aumento de 3,8% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI, e na comparação entre 7DPI ($\bar{x}=109,1s$) e 14DPI (119,5s), encontramos um aumento de 9,5% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI.

A comparação entre o grupo G100 (Gráfico 19A), no tempo -1TAI ($\bar{x}=110,1s$) com o tempo 7DPI ($\bar{x}=118,9s$), apresentou um aumento de 7,5% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI, enquanto que a comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=110,1s$) e 14DPI ($\bar{x}=111,7s$) apresentou um aumento de 1,4% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI, e a comparação entre 7DPI ($\bar{x}=118,9s$) e 14DPI ($\bar{x}=111,7s$) apresentou uma diminuição de 6,0% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI.

A análise comparativa temporal dos grupos AC e G100 (Gráfico 19A) não apresentou significância entre os tempos de análise, mas houve diferenças entre os grupos.

Nessa avaliação o grupo G100 apresentou no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=115,1s$; G100 $\bar{x}=110,1s$) uma diminuição de 4,3% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade, no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=109,1s$; G100 $\bar{x}=118,9s$) um aumento de 8,9% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade, e no tempo 14DPI (AC

$\bar{x}=119,5s$; G100 $\bar{x}=111,7s$) uma diminuição de 2,0% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade.

Já na avaliação dos animais dos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção tempo 42DPI (Gráfico 19B), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC apresentou significância nas comparações entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=79,6s$) e 7DPI ($\bar{x}=138s$), ocorrendo aumento de 42,3% ($P\leq 0,01$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI.

Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=79,6s$) e 42DPI (92,3s) encontramos significância e um aumento de 15,9% ($P\leq 0,001$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI, e na comparação entre 7DPI ($\bar{x}=138s$) e 42DPI (92,3s), encontramos significância e uma diminuição de 33,1% ($P\leq 0,01$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI.

O grupo G100 (Gráfico 19B), apresentou significância nas comparações entre o tempo -1TAI ($\bar{x}=88,5s$) e 7DPI ($\bar{x}=128,2s$), com um aumento de 44,8% ($P\leq 0,0001$) na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI.

Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=88,5s$) e 42DPI (86,2s) não encontramos significância e ocorreu diminuição de 2,6% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=128,2s$) e 42DPI (86,2s) encontramos significância e diminuição de 32,7% ($P\leq 0,0001$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI.

Na comparação temporal entre AC e G100 (Gráfico 19B), não foram encontradas significâncias entre os tempos de análise, mas encontramos diferenças entre os grupos nos tempos -1TAI (AC $\bar{x}=79,6s$; G100 $\bar{x}=88,5s$), com aumento de 11,1% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G100, 7DPI (AC $\bar{x}=138s$; G100 $\bar{x}=128,2s$), com diminuição de 7,1% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G100, e 42DPI (AC $\bar{x}=92,3s$; G100 $\bar{x}=86,2s$), com diminuição de 6,6% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G100.

A avaliação da latência para o primeiro episódio de imobilidade dos grupos AC e G1000, animais eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 19C), não gerou significância quando realizamos avaliações entre os grupos em cada tempo de análise, mas as médias da latência para o primeiro episódio de imobilidade apresentaram diferenças percentuais entre os tempos de análise.

O grupo AC, apresentou na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=48,2s$) e 7DPI ($\bar{x}=38,7s$) uma diminuição de 19,7% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=48,2s$) e 14DPI (44,2s) encontramos diminuição de 8,2% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=38,7s$) e 14DPI (44,2s), encontramos um aumento de 14,2% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 19C), apresentou na sua comparação entre o tempo -1TAI ($\bar{x}=50s$) e o tempo 7DPI ($\bar{x}=42,6s$), uma diminuição de 14,8% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI, enquanto que, a comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=50s$) e 14DPI ($\bar{x}=47,4s$) apresentou uma diminuição de 5,2% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI, e a comparação entre 7DPI ($\bar{x}=42,6s$) e 14DPI ($\bar{x}=47,4s$) apresentou um aumento de 11,2% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 14DPI.

A comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico 19C) não apresentou significância entre os tempos de análise, mas encontramos diferenças entre as médias dos grupos no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=48,2s$; G1000 $\bar{x}=50s$), com um aumento de 3,7% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G1000. No tempo 7DPI (AC $\bar{x}=38,7s$; G1000 $\bar{x}=42,6s$) com um aumento de 10,0% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC $\bar{x}=44,2s$; G1000 $\bar{x}=47,4s$) com um aumento de 7,2% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G1000.

Na avaliação dos animais AC e G1000, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 19D), não encontramos significância no grupo AC quando comparamos os tempos -1TAI ($\bar{x}=48s$) e 7DPI ($\bar{x}=43,5s$), ocorrendo diminuição de 9,3% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=48s$) e 42DPI ($\bar{x}=33,3s$), encontramos significância e diminuição de 30,6% ($P\leq 0,05$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI, e na comparação entre 7DPI ($\bar{x}=43,5s$) e 42DPI ($\bar{x}=33,3s$), encontramos significância e diminuição de 23,4% ($P\leq 0,05$) na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI.

A análise do grupo G1000 (Gráfico 19D), entre os tempos, não apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=48s$) e 7DPI ($\bar{x}=44,6s$), mas

ocorreu diminuição de 7,0% na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 7DPI.

Os tempos -1TAI ($\bar{x}=48s$) e 42DPI ($\bar{x}=34,7s$) apresentaram significância e diminuição de 22,5% ($P\leq 0,001$) na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI, e a comparação entre 7DPI ($\bar{x}=44,6s$) e 42DPI ($\bar{x}=34,7s$), apresentou significância e diminuição de 22,2% ($P\leq 0,01$) na média de latência para o primeiro episódio de imobilidade no tempo 42DPI

Na comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico19D), não foi encontrada significância entre os tempos de análise, e não encontramos diferenças entre as médias de latência para o primeiro episódio de imobilidade dos grupos no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=48s$; G1000 $\bar{x}=48s$). Já no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=43,5s$; G1000 $\bar{x}=44,6s$) encontramos um aumento de 2,5% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G1000, e no tempo 42DPI (AC $\bar{x}=33,3s$; G1000 $\bar{x}=34,7s$) encontramos um aumento de 4,2% na média da latência para o primeiro episódio de imobilidade do grupo G1000.

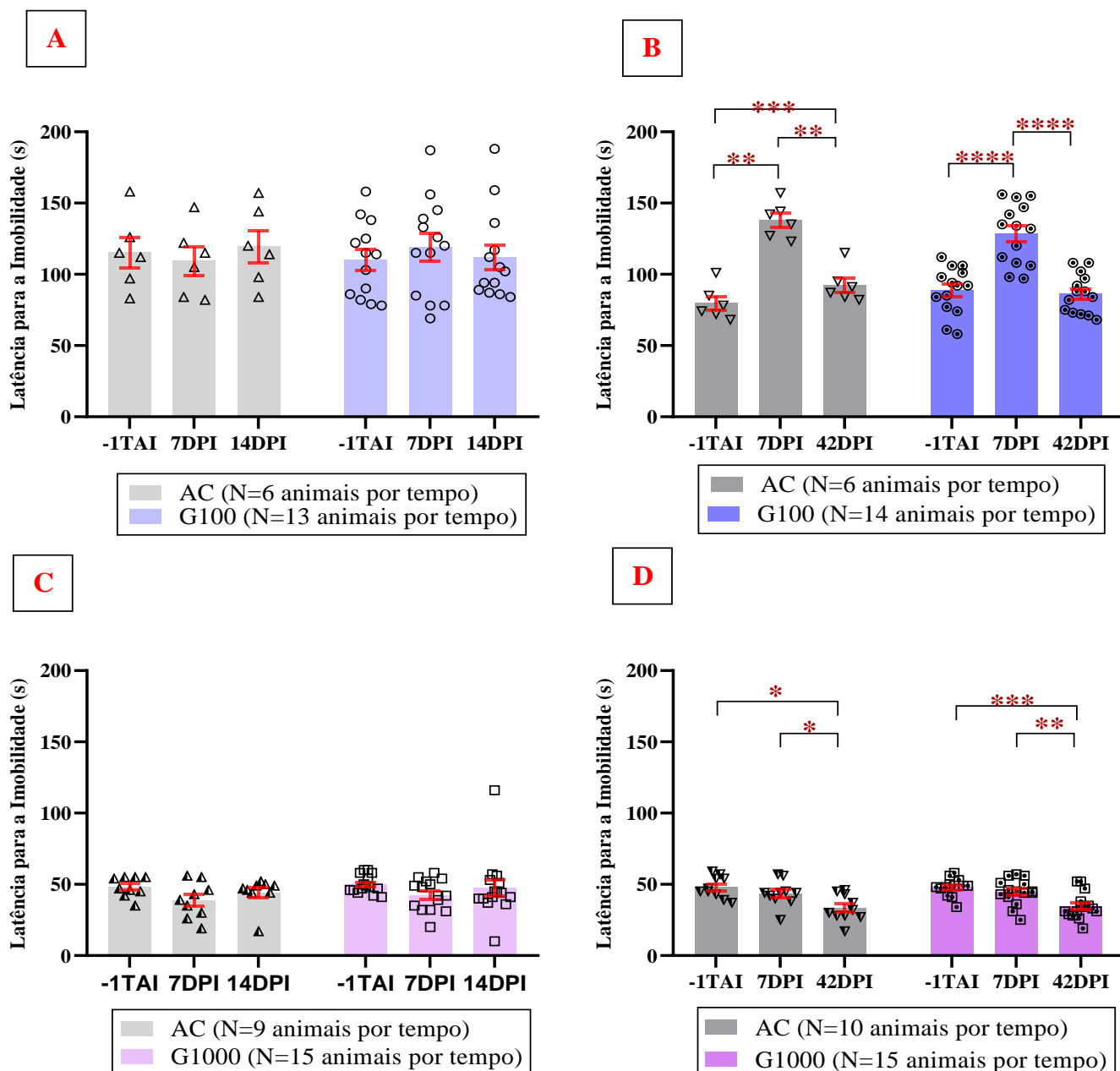


Gráfico 19: Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Latência para o primeiro episódio de imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção.**

5.3.2.2. Tempo total de imobilidade no teste do Nado Forçado

Nas análises dos grupos AC e G100, eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 20A), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC não apresentou significância nas análises temporais, mas houve diferenças nas comparações entre as médias de imobilidade nos tempos -1TAI ($\bar{x}=127,6s$) e 7DPI ($\bar{x}=151s$), com aumento de 18,3% na média do tempo total de imobilidade no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=127,6s$) e 14DPI ($\bar{x}=134,5s$), encontramos um aumento de 5,4% na média do tempo total de imobilidade no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=151s$) e 14DPI (134,5s) encontramos uma diminuição de 10,9% na média do tempo total de imobilidade no tempo 14DPI.

O grupo G100 (Gráfico 20A), apresentou na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=131,0s$) e 7DPI ($\bar{x}=140,8s$) um aumento de 7,4% na média do tempo total de imobilidade no tempo 7DPI. Já nos tempos -1TAI ($\bar{x}=131s$) e 14DPI ($\bar{x}=131,0s$) não foram encontradas alterações na média do tempo total de imobilidade, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=140,8s$) e 14DPI ($\bar{x}=131s$) encontramos uma diminuição de 7,4% na média do tempo total de imobilidade no tempo 14DPI.

Na comparação temporal entre AC e G100 (Gráfico 20A), não foi encontrada significância entre os tempos de análise. Mas encontramos no grupo G100 no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=127,6s$; G100 $\bar{x}=131s$) um aumento de 2,6% na média do tempo total de imobilidade, no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=151s$; G100 $\bar{x}=140,8s$) uma diminuição de 6,7% na média do tempo total de imobilidade do grupo G100, e no tempo 14DPI (AC $\bar{x}=134,5s$; G100 $\bar{x}=131s$) encontramos uma diminuição de 2,6% na média do tempo total de imobilidade.

A avaliação dos animais dos grupos AC e G100, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 20B), não apresentou significância no grupo AC, ocorrendo na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=96,5s$) e 7DPI ($\bar{x}=96,8s$) um aumento de 0,3% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Nos tempos -1TAI ($\bar{x}=96,5s$) e 42DPI ($\bar{x}=110,1s$) encontramos um aumento de 14,9% na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=96,8s$) e 42DPI (110,1s) encontramos um aumento de 13,7% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI.

O grupo G100 (Gráfico 20B), não apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=97,4s$) e 7DPI ($\bar{x}=109,8s$), mas ocorreu um aumento de 12,7% na

média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=97,4s$) e 42DPI ($\bar{x}=145,2s$) encontramos significância e um aumento de 49,0% ($P\leq 0,001$) na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=109,8s$) e 42DPI ($\bar{x}=145,2s$) encontramos significância e um aumento de 32,2% ($P\leq 0,001$) na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI.

Na comparação temporal entre AC e G100 (Gráfico 20B), não foi encontrada significância no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=96,5s$; G100 $\bar{x}=97,4s$), mas encontramos um aumento de 0,9% na média do tempo total de imobilidade do grupo G100. No tempo 7DPI (AC $\bar{x}=96,8s$; G100 $\bar{x}=109,8s$) não encontramos significância, e ocorreu um aumento de 13,4% na média do tempo total de imobilidade do grupo G100, e no tempo 42DPI (AC $\bar{x}=110,1s$; G100 $\bar{x}=145,2s$) encontramos significância e um aumento de 31,8% ($P\leq 0,01$) na média do tempo total de imobilidade do grupo G100.

As análises dos grupos AC e G1000, eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 20C), não apresentaram significância em relação ao grupo AC, mas houve diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade entre os tempos.

Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=196s$) e 7DPI ($\bar{x}=214,4s$) encontramos um aumento de 9,3% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Na comparação entre -1TAI ($\bar{x}=196s$) e 14DPI ($\bar{x}=192,2s$) encontramos uma diminuição de 1,9% na média do tempo total de imobilidade do tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=214,4s$) e 14DPI (192,2s) encontramos uma diminuição de 10,3% na média do tempo total de imobilidade do tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 20C), não apresentou significância na comparação entre os tempos, mas ocorreu diferenças na média do tempo total de imobilidade. A comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=124,8s$) e 7DPI ($\bar{x}=158s$) apresentou um aumento de 26,6% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=124,8s$) e 14DPI ($\bar{x}=174s$) encontramos um aumento de 39,4% na média do tempo total de imobilidade do tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=158s$) e 14DPI ($\bar{x}=174s$) encontramos um aumento de 10,1% na média do tempo total de imobilidade do tempo 14DPI.

Na comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico 20C) encontramos significância no tempo -1TAI (AC $\bar{x}=196s$; G1000 $\bar{x}=124,8s$) ocorrendo diminuição de 36,3% ($P\leq 0,05$) na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000, no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=214,4s$; G1000 $\bar{x}=158s$) não encontramos significância e ocorreu uma diminuição

de 26,3% na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =192,2s; G1000 \bar{x} =174s) não encontramos significância e ocorreu uma diminuição de 9,4% na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000.

A avaliação dos animais dos grupos AC e G1000, eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI (Gráfico 20D), não apresentou significância nos grupos, mas ocorreu diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade.

O grupo AC nos tempos -1TAI (\bar{x} =190,5s) e 7DPI (\bar{x} =196,6s) apresentou um aumento de 3,2% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =190,5s) e 42DPI (\bar{x} =225,3s) ocorreu um aumento de 18,2% na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =196,6s) e 42DPI (225,3s) encontramos um aumento de 14,5% na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 20D), nos tempos -1TAI (\bar{x} =178,5s) e 7DPI (\bar{x} =177,7s) apresentou uma diminuição de 0,4% na média do tempo total de imobilidade do tempo 7DPI. Já na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =178,5s) e 42DPI (\bar{x} =197,7s) encontramos um aumento de 10,7% na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =177,7s) e 42DPI (\bar{x} =197,7s) ocorreu um aumento de 11,2% na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI.

A comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico 20D) não apresentou significância em nenhuma das comparações, mas encontramos diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade, apresentando o tempo -1TAI (AC \bar{x} =190,5s; G1000 \bar{x} =178,5s) uma diminuição de 6,2% na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000. No tempo 7DPI (AC \bar{x} =196,6s; G1000 \bar{x} =177,7s) encontramos uma diminuição de 9,6% na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000, e no tempo 42DPI (AC \bar{x} =225,3s; G1000 \bar{x} =197,7s) encontramos uma diminuição de 12,2% na média do tempo total de imobilidade do grupo G1000.

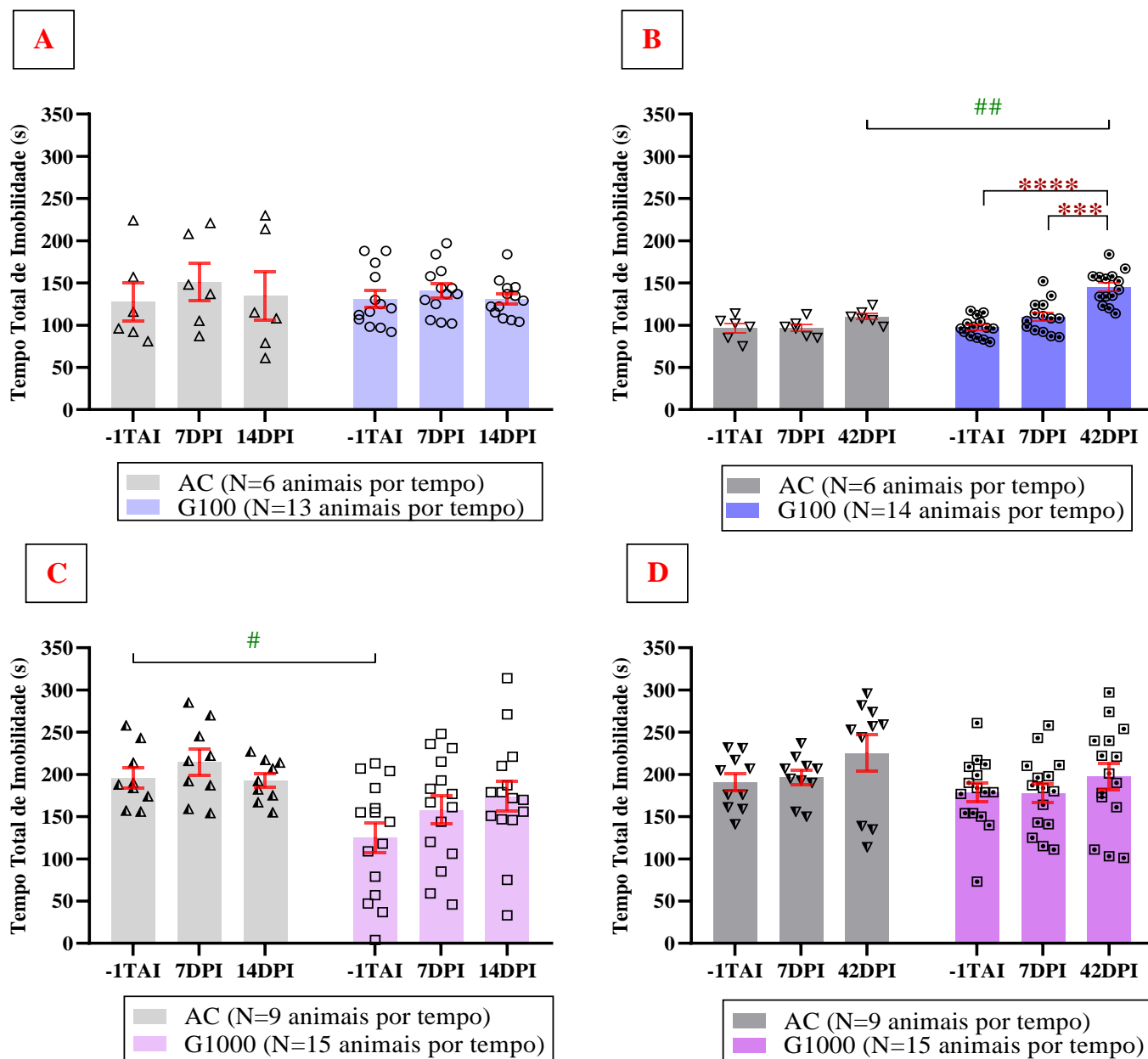


Gráfico 20: Latência para imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, fase aguda da infecção 7DPI, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Tempo total de imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Latência para imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Tempo total de imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Tempo total de imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção, já $\#P \leq 0,05$, $##P \leq 0,01$, $###P \leq 0,001$ e $####P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e seus respectivos grupos de infecção G100 e G1000.

5.3.2.3. Tempo total de mobilidade durante o teste do Nado Forçado

Nas análises dos grupos AC e G100, eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 21A), encontramos os seguintes resultados.

O grupo AC não apresentou significância nas comparações ente os tempos -1TAI (\bar{x} =148,3s) e 7DPI (\bar{x} =133s), mas apresentou uma diminuição de 10,3% na média do tempo total de mobilidade no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =148,3s) e 14DPI (\bar{x} =171s) não foi apresentada significância mas, ocorreu um aumento de 15,3% na média do tempo total de mobilidade no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =133s) e 14DPI (171s) não encontramos significância, mas ocorreu um aumento de 28,5% na média do tempo total de mobilidade do tempo 14DPI.

O grupo G100 (Gráfico 21A), nos tempos -1TAI (\bar{x} =147,9s) e 7DPI (\bar{x} =135,8s) não apresentou significância, mas encontramos uma diminuição de 8,1% na média do tempo total de mobilidade no tempo 7DPI. Na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =147,9s) e 14DPI (\bar{x} =171,3s) encontramos um aumento de 15,8% na média do tempo total de mobilidade no tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =147,9s) e 14DPI (\bar{x} =171,3s) encontramos significância e um aumento de 26,1% ($P \leq 0,01$) na média do tempo total de imobilidade do tempo 42DPI.

A comparação temporal entre AC e G100 (Gráfico 21A) não apresentou significância em nenhuma das comparações, mas encontramos diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade ocorrendo no tempo -1TAI (AC \bar{x} =148,3s; G100 \bar{x} =147,9s) uma diminuição de 0,2% na média do tempo total de mobilidade do grupo G100. No tempo 7DPI (AC \bar{x} =171s; G100 \bar{x} =147,9s) encontramos uma diminuição de 13,5% na média do tempo total de mobilidade do grupo G100, e no tempo 14DPI (AC \bar{x} =171s; G100 \bar{x} =171,3s) encontramos um aumento de 0,1% na média do tempo total de mobilidade do grupo G100.

A comparação dos grupos AC e G100 (Gráfico 21B), dos animais eutanasiados no tempo 42DPI, não apresentou significância no grupo AC, que na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =142,1s) e 7DPI (\bar{x} =166,6s) apresentou um aumento de 17,2% na média do tempo total de mobilidade no tempo 7DPI. Já na comparação entre os tempos -1TAI (\bar{x} =142,1s) e 42DPI (\bar{x} =148,1s) encontramos um aumento de 4,2% na média do tempo total de mobilidade no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI (\bar{x} =166,6s) e 42DPI (\bar{x} =148,1s) encontramos uma diminuição de 11,1% na média do tempo total de mobilidade no tempo 42DPI.

O grupo G100 (Gráfico 21B), não apresentou significância na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=155,3s$) e 7DPI ($\bar{x}=166,7s$), no qual encontramos um aumento de 7,3% na média do tempo total de mobilidade no tempo 7DPI. Nos tempos -1TAI ($\bar{x}=155,3s$) e 42DPI ($\bar{x}=145,7s$) não encontramos significância, mas ocorreu diminuição de 6,1% na média do tempo total de mobilidade no tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=166,7s$) e 42DPI ($\bar{x}=145,7s$) encontramos significância e uma diminuição de 12,5% ($P\leq 0,05$) na média do tempo total de mobilidade no tempo 42DPI.

A comparação temporal entre AC e G100 (Gráfico 21B) não apresentou significância em nenhuma das comparações, mas encontramos diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade. O tempo -1TAI (AC $\bar{x}=142,1s$; G100 $\bar{x}=155,3s$) apresentou um aumento de 9,2% na média do tempo total de mobilidade do grupo G100. Já no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=166,6s$; G100 $\bar{x}=166,7s$) não encontramos diferenças entre as médias do tempo total de mobilidade dos grupos, e no tempo 42DPI (AC $\bar{x}=148,1s$; G100 $\bar{x}=145,7s$) encontramos uma diminuição de 1,6% na média do tempo total de mobilidade do grupo G100.

A comparação entre AC e G1000, eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI (Gráfico 21C), não apresentou significância, mas encontramos diferenças entre a média do tempo total de mobilidade entre os tempos.

O grupo AC apresentou na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=164s$) e 7DPI ($\bar{x}=145,4s$) uma diminuição de 11,3% na média do tempo total de mobilidade do tempo 7DP. Já na comparação entre -1TAI ($\bar{x}=164s$) e 14DPI ($\bar{x}=167,1s$) ocorreu um aumento de 1,8% na média do tempo total de mobilidade do tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=145,4s$) e 14DPI ($\bar{x}=167,1s$) encontramos um aumento de 14,9% na média do tempo total de mobilidade do tempo 14DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 21C), na comparação dos tempos -1TAI ($\bar{x}=235,1s$) e 7DPI ($\bar{x}=201,9s$) encontrou uma diminuição de 14,1% na média do tempo total de mobilidade do tempo 7DPI. Já na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=235,1s$) e 14DPI ($\bar{x}=185,9s$) encontramos uma diminuição de 20,9% na média do tempo total de mobilidade do tempo 14DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=201,9s$) e 14DPI ($\bar{x}=185,9s$), encontramos uma diminuição de 7,9% na média total de mobilidade do tempo 14DPI.

Na comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico 21C) encontramos significância entre os tempos -1TAI (AC $\bar{x}=164s$; G1000 $\bar{x}=235,1s$), que apresentou um

aumento de 43,3% ($P \leq 0,05$) na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000. Já no tempo 7DPI (AC $\bar{x}=245,4s$; G1000 $\bar{x}=201,9s$) não encontramos significância e ocorreu uma diminuição de 17,7% na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000, e no tempo 14DPI (AC $\bar{x}=167,1s$; G1000 $\bar{x}=185,9s$) não encontramos significância e ocorreu um aumento de 11,2% na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000.

A avaliação dos animais dos grupos AC e G1000 (Gráfico 21D), eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI, não apresentou significância na comparação entre os tempos dos grupos, mas houve diferenças entre as médias do tempo total de mobilidade.

O grupo AC na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=169,5s$) e 7DPI ($\bar{x}=163,3s$) apresentou uma diminuição de 3,6% na média do tempo total de mobilidade no tempo 7DPI. Já na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=169,5s$) e 42DPI ($\bar{x}=118,2s$) encontramos uma diminuição de 30,2% na média do tempo total de mobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=163,3s$) e 42DPI ($\bar{x}=118,2s$), encontramos uma diminuição de 27,6% na média do tempo total de mobilidade do tempo 42DPI.

O grupo G1000 (Gráfico 21D), na comparação entre os tempos -1TAI ($\bar{x}=181,4s$) e 7DPI ($\bar{x}=182,2s$) apresentou um aumento de 0,4% na média do tempo total de mobilidade do tempo 7DPI. Já na comparação entre -1TAI ($\bar{x}=181,4s$) e 42DPI ($\bar{x}=168,7s$), encontramos uma diminuição de 7,0% na média do tempo total de mobilidade do tempo 42DPI, e na comparação entre os tempos 7DPI ($\bar{x}=182,2s$) e 42DPI ($\bar{x}=168,7s$) encontramos uma diminuição de 7,4% na média do tempo total de mobilidade do tempo 42DPI.

A comparação temporal entre AC e G1000 (Gráfico 21D) não apresentou significância em nenhuma das comparações, mas encontramos diferenças entre as médias do tempo total de imobilidade.

O tempo -1TAI (AC $\bar{x}=169,5s$; G1000 $\bar{x}=181,4s$) apresentou um aumento de 7,0% na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000. O tempo 7DPI (AC $\bar{x}=163,3s$; G1000 $\bar{x}=182,2s$) apresentou aumento de 11,5% na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000, e no tempo 42DPI (AC $\bar{x}=118,2s$; G1000 $\bar{x}=168,7s$) encontramos um aumento de 42,7% na média do tempo total de mobilidade do grupo G1000.

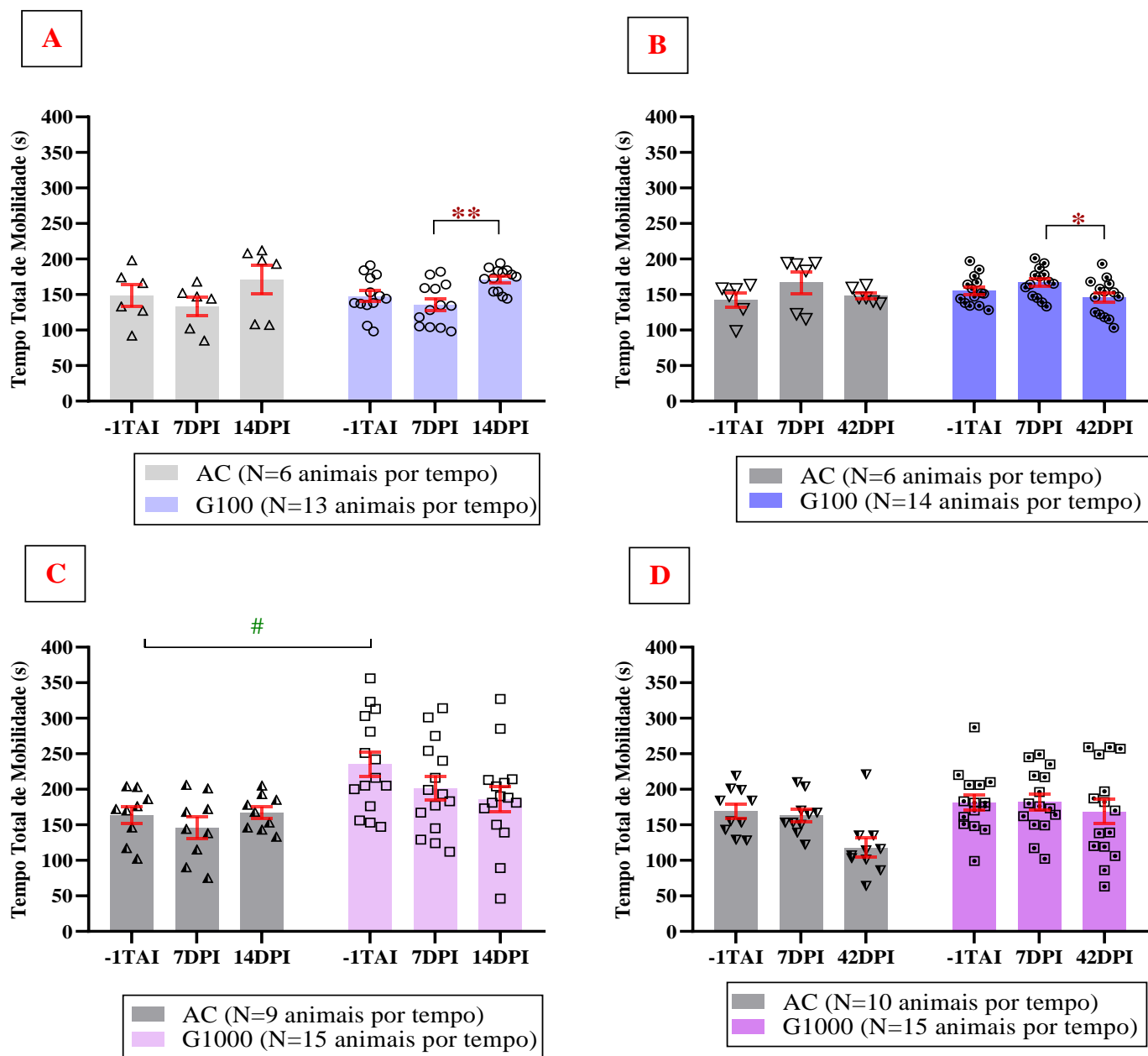


Gráfico 21: Latência para imobilidade dos camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre o tempo antes da infecção -1TAI, a fase aguda da infecção 7DPI, a fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI. (A) Latência para imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (B) Latência para imobilidade dos animais G100 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI. (C) Latência para imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase subaguda da infecção 14DPI. (D) Latência para imobilidade dos animais G1000 e AC eutanasiados na fase crônica da infecção 42DPI.

Representação gráfica com média \pm SEM (erro padrão das médias) com análise por teste ANOVA Two-Way e múltipla comparação com teste Bonferroni. Onde $*P \leq 0,05$, $**P \leq 0,01$, $***P \leq 0,001$ e $****P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os tempos de infecção, já $\#P \leq 0,05$, $##P \leq 0,01$, $###P \leq 0,001$ e $####P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos AC e seus respectivos grupos de infecção G100 e G1000.

5.4. Análise dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como marcador da infecção

Após anestesia dos animais para eutanásia, foi realizada exsanguinação pelo plexo sanguíneo ocular, coletando-se sangue para dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas, por método de ELISA, na fase subaguda da infecção 14 DPI e na fase crônica da infecção 42 DPI.

Logo, na avaliação de absorvância das quimiocinas CCL-5 e CCL-24, não obtivemos resultados significativos em comparação com a curva padrão. Já as citocinas, IL-6 e TNF- α , e a quimiocina CCL-17, apresentaram absorvância em relação a curva padrão, levando a análises comparativas entre os grupos AC, G100 e G1000 na fase subaguda da infecção 14DPI e na fase crônica da infecção 42DPI.

Os resultados foram avaliados quanto ao perfil pró-inflamatório, por meio do teste Kruskal-Wallis, sendo observado o P significativo na comparação entre os grupos AC, G100 e G1000 na fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42 DPI, encontrando-se significância ($P \leq 0,0001$) na citocina TNF- α e quimiocina CCL-17.

Enquanto a avaliação de IL-6, utilizando o teste de múltipla comparação de Dunn's, não apresentou nenhuma alteração em comparação aos grupos G100 e G1000 com o grupo AC, na comparação de G100 e G1000 com eles mesmos, e na comparação entre G100 e G1000 (Gráfico 22A).

Ao analisarmos a citocina TNF- α , por meio do teste de Kruskal-Wallis, observamos um P significativo quando comparamos o grupo AC com o grupo G100, havendo um aumento dos níveis dosados na fase subaguda da infecção 14 DPI ($\bar{x}=13,7$ pg/ml) com $P \leq 0,001$, enquanto na fase crônica da infecção 42DPI ($\bar{x}=11,8$ pg/ml) a significância foi de $P \leq 0,01$ no grupo G100. Já na comparação do grupo AC e G1000 encontramos um aumento dos níveis dosados na fase subaguda da infecção 14DPI ($\bar{x}=27,8$ pg/ml) e na fase crônica da infecção 42DPI ($\bar{x}=53,4$ pg/ml) com $P \leq 0,0001$.

Na avaliação de TNF- α , comparando os níveis dosados de G100 e G1000 com eles mesmos, e na comparação de G100 com G1000 nos tempos de análise, não foram encontradas significâncias nas análises (Gráfico 22B).

Na análise da quimiocina CCL-17 pelo teste de Kruskal-Wallis, observamos aumento dos níveis dosados no grupo G100 no tempo 14DPI ($\bar{x}=10,4$ pg/ml) com $P \leq 0,05$ e no grupo G1000 no tempo 42DPI ($\bar{x}=17,5$ pg/ml) com $P \leq 0,0001$, em comparação ao grupo AC. Na comparação dos grupos G100 e G1000, com eles mesmos, não foi

encontrada significância. Já a comparação de G100 ($\bar{x}=5,79$ pg/ml) com G1000 ($\bar{x}=17,5$ pg/ml) no tempo 42DPI, encontramos um aumento do nível dosado no grupo G1000, com $P \leq 0,01$ (Gráfico 22C).

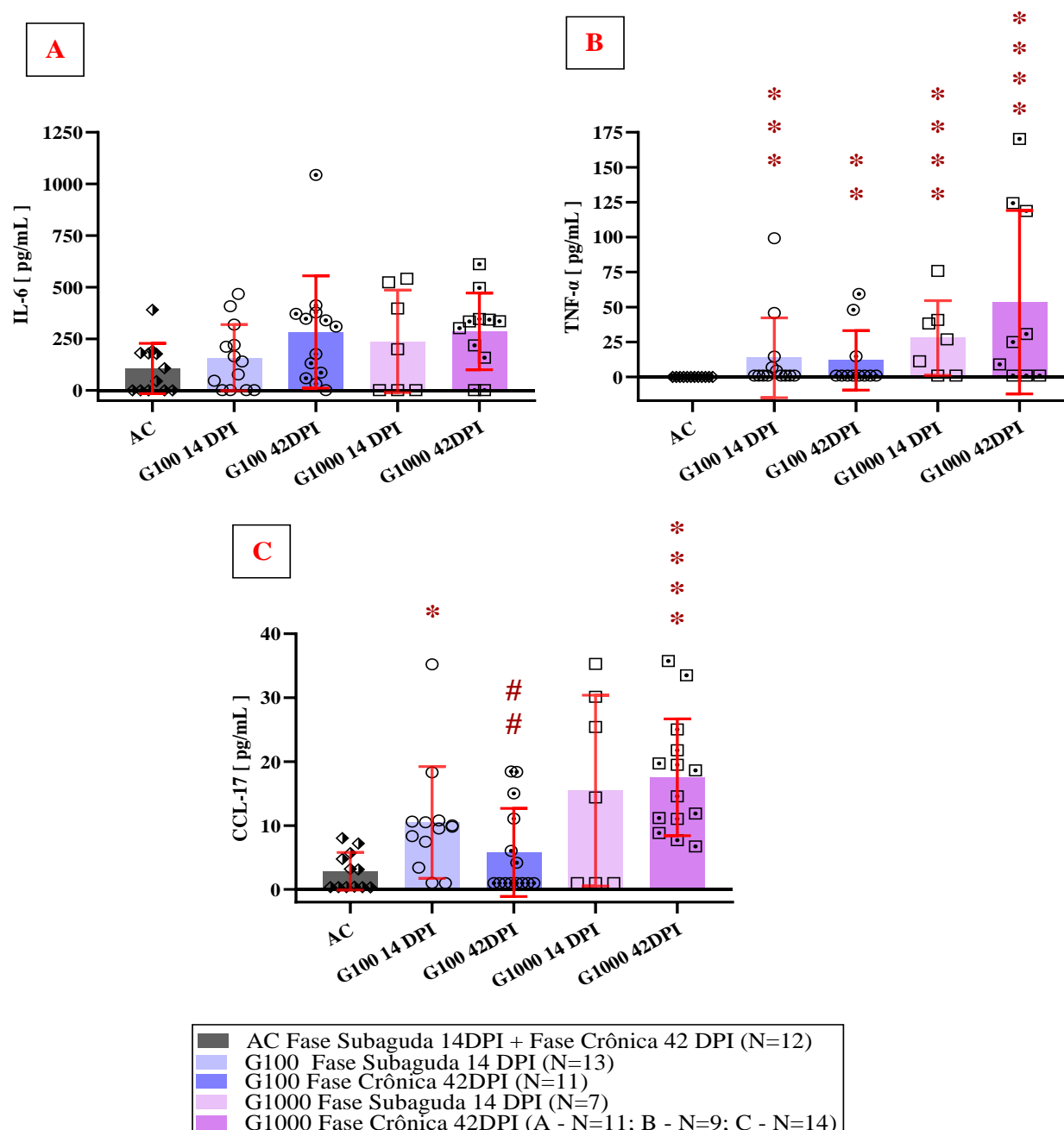


Gráfico 22: Quantificação das citocinas IL-6 e TNF- α , e da quimiocina CCL-17 em soro de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Níveis de IL-6 quantificados por ELISA. (B) Níveis de TNF- α quantificados por ELISA. (C) Níveis de CCL-17 quantificados por ELISA.

Representação gráfica com mediana e interquartil das diferenças entre os grupos avaliados pelo teste de Dunn's para dados não paramétricos. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre G100 e G1000 com o grupo AC, enquanto ## $P \leq 0,01$, indica a comparação entre os grupos G100 e G1000.

5.5. Identificação de alterações patológicas na infecção por meio da descrição de aspectos histológicos na fase subaguda e crônica da infecção

5.5.1. Histopatologia pulmonar e hepática – Processamento tecidual em bloco de parafina com coloração em hematoxilina e eosina (HE)

5.5.1.1. Análise semiquantitativa e qualitativa das lesões pulmonares provocadas pela migração larval de *Toxocara canis*

A avaliação da infecção com cargas distintas e inflamação no tecido pulmonar e hepático, foi realizada, por meio de análise histopatológica semiquantitativa.

Na avaliação dos pulmões em análise peribrônquica (Gráfico 23A) e perivascular (Gráfico 23B), encontramos na fase subaguda da infecção 14 DPI, um aumento da inflamação no grupo G1000 ($P \leq 0,01$) quando comparado ao G100. Ocorrendo repetição da situação na fase crônica da infecção 42 DPI, com G1000 ($P \leq 0,05$), apresentando um aumento da inflamação quando comparado aos grupos AC e G100.

A análise, quanto a inflamação de parênquima (Gráfico 23C) dos pulmões, não apresentou significância.

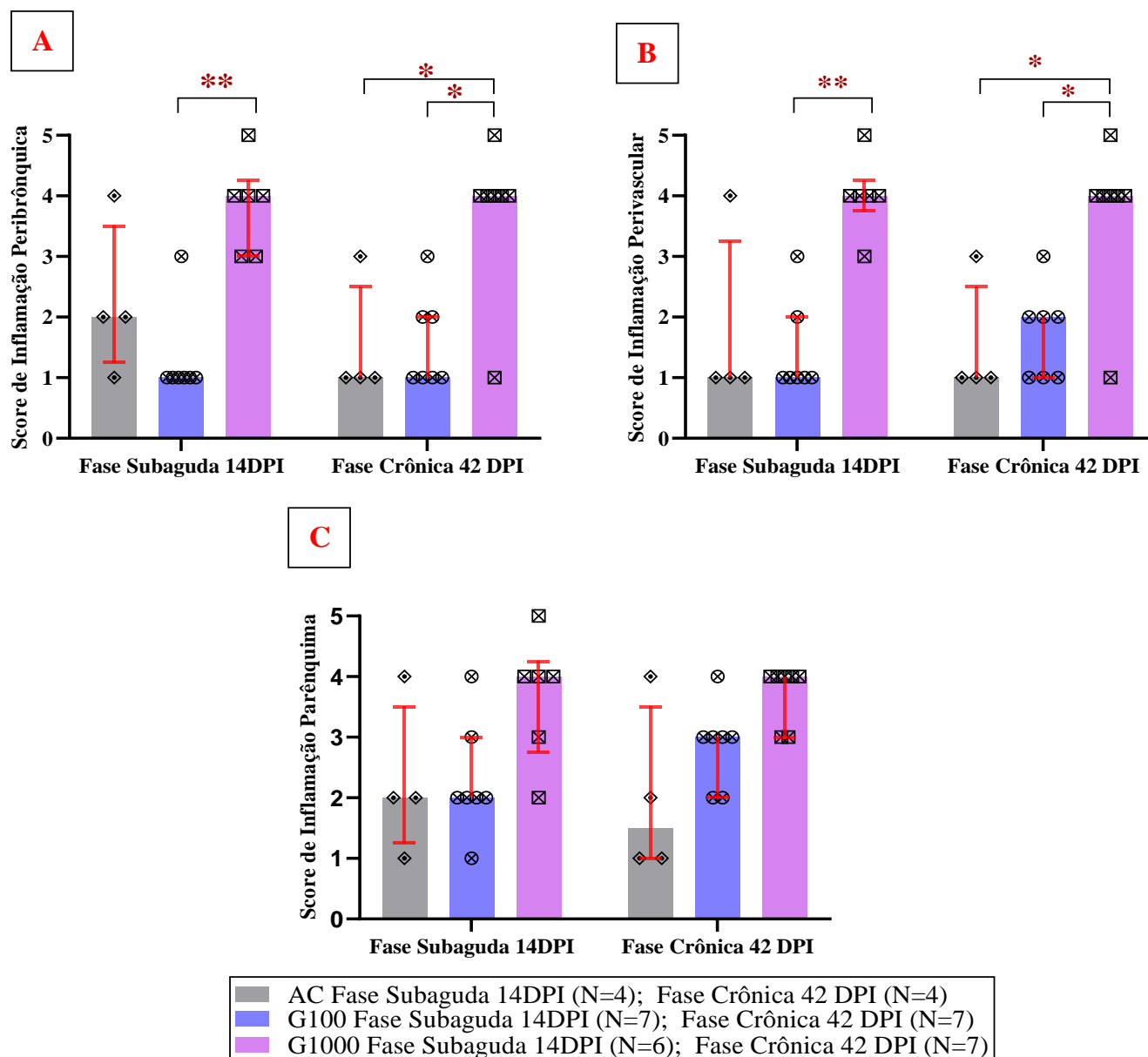


Gráfico 23: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, dada por score de inflamação para comparação entre a fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Inflamação peribrônquica. (B) Inflamação perivascular. (C) Inflamação parênquima.

Representação gráfica com mediana e interquartil das diferenças entre os grupos avaliados pelo teste de Bonferroni's para dados não paramétricos. Onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ e **** $P \leq 0,0001$ indicam a comparação entre os grupos.

Na inflamação pulmonar total (Gráfico 24A), encontramos na fase subaguda da infecção 14 DPI, aumento da inflamação no grupo G1000 ($P \leq 0,05$) quando comparado ao G100. Na análise da na fase crônica da infecção 42 DPI, encontramos o mesmo resultado ao comparar o G1000 ($P \leq 0,05$) com AC e G100.

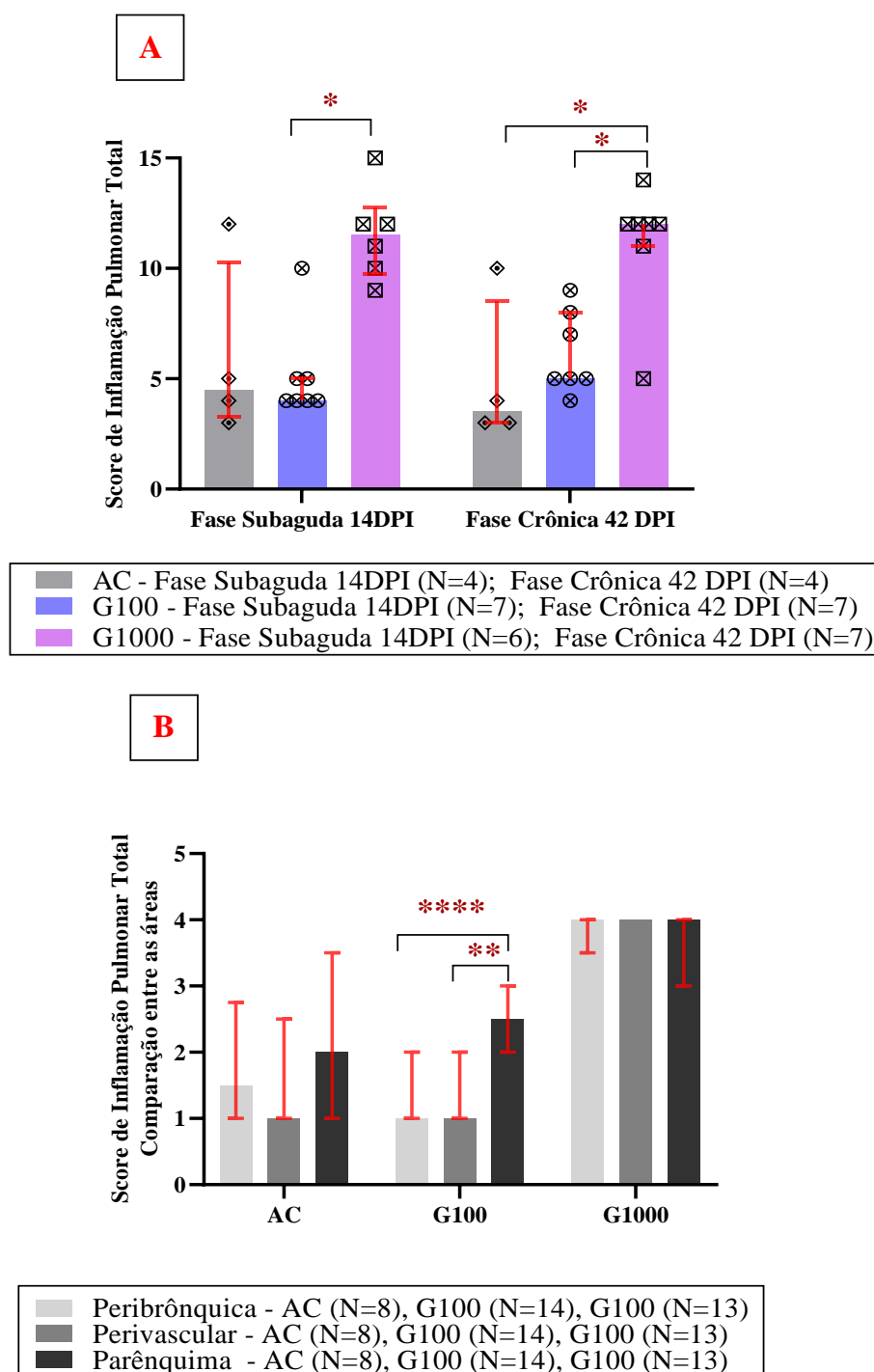


Gráfico 24: Avaliação histopatológica semiquantitativa da inflamação pulmonar total de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, dada por score de inflamação. (A) Inflamação pulmonar total. (B) Inflamação pulmonar total com comparação dentro dos grupos quanto as áreas inflamadas e comparação entre as áreas.

Representação gráfica com mediana e interquartil das diferenças entre os grupos e áreas de inflamação avaliados pelo teste de Bonferroni's para dados não paramétricos. Onde # $P \leq 0,05$ indica a comparação entre G1000 e AC e G100 na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI da infecção, e ** $P \leq 0,001$ e *** $P \leq 0,0001$ indica a comparação entre inflamação peribrônquica, perivascular e de parênquima no grupo G100.

espessamento de septo interalveolar do parênquima (Figura 18C), edema perivascular e infiltrado peribronquiolar (Figura 18D) no grupo G100. No grupo G1000 foi identificado espessamento de septo interalveolar no parênquima pulmonar (Figura 18E) e infiltrado peribronquiolar (Figura 18F).

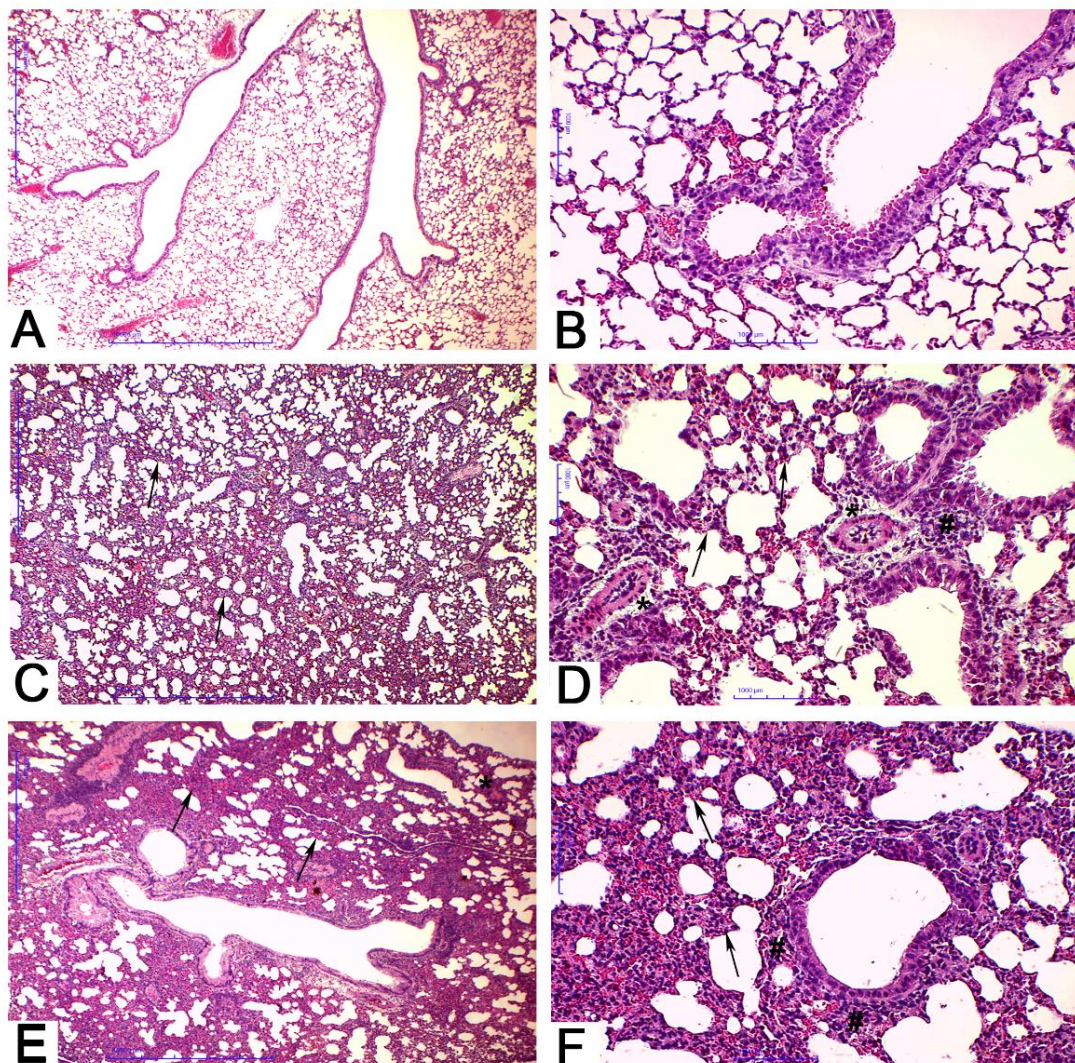


Figura 18: Fotomicrografia do pulmão de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Grupo controle Aspecto morfológico habitual do parênquima pulmonar. (B) Grupo controle: Maior aumento da imagem anterior. (C) Grupo G100: Imagem panorâmica do parênquima pulmonar exibindo espessamento de septos interalveolares (setas) devido a presença do infiltrado inflamatório. (D) Grupo G100: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, espessamento de septos interalveolares (setas), edema perivascular (*), infiltrado peribronquiolar (#). (E) Grupo G1000: Imagem panorâmica do parênquima pulmonar apresentando grande espessamento de septos interalveolares (setas). (F) Grupo G1000: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, grande espessamento de septos interalveolares (setas), infiltrado peribronquiolar (#). Barras = 1.000 µm.

5.5.1.2. Análise semiquantitativa e qualitativa das lesões hepáticas provocadas pela migração larval de *Toxocara canis*

Na análise semiquantitativa das lesões do tecido hepático encontramos na fase subaguda da infecção 14 DPI, uma quantidade maior de lesões no grupo G1000 ($P \leq 0,05$) em comparação ao grupo AC, e na comparação entre G1000 ($P \leq 0,001$) e G100. Além disso, encontramos uma maior quantidade de lesões na comparação entre G1000 ($P \leq 0,05$) e o grupo AC, na fase crônica da infecção 42 DPI (Gráfico 26A).

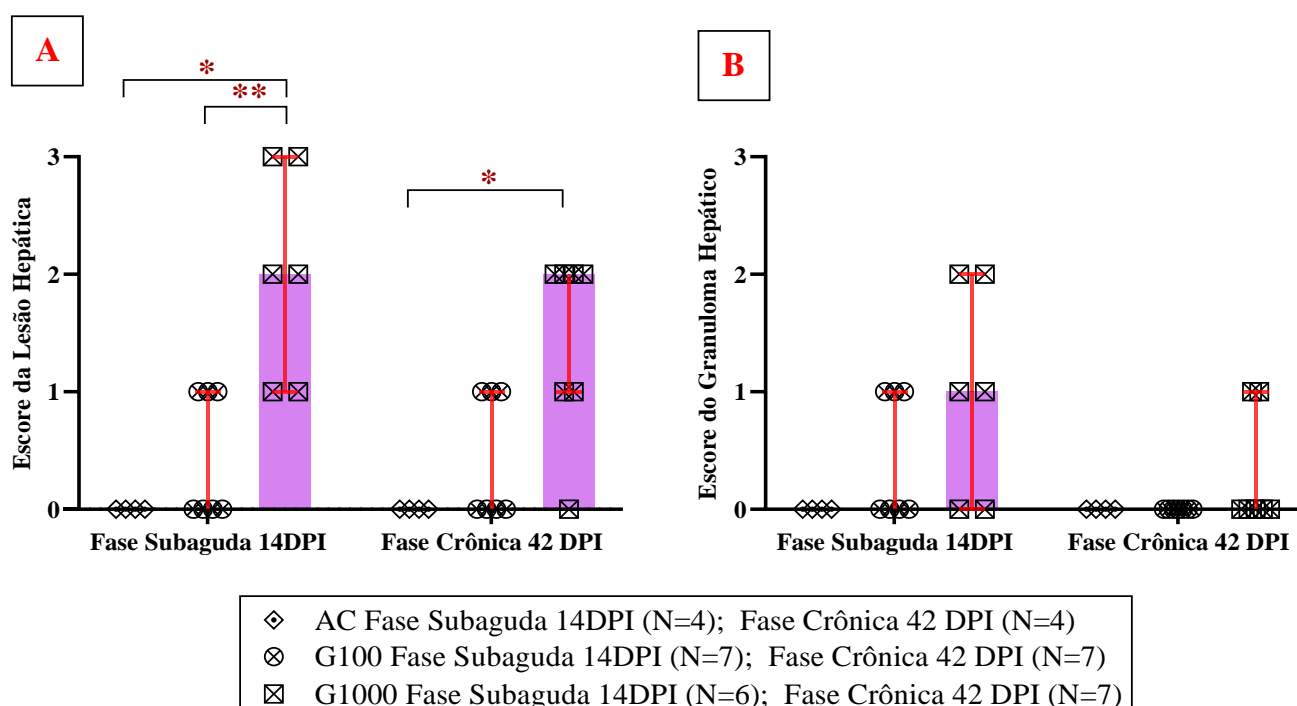


Gráfico 26: Avaliação histopatológica semiquantitativa de lesão e granuloma hepático de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, dado por escore. (A) Score da lesão hepática, diferenças entre os grupos AC, G100 e G1000.

Representação gráfica com mediana e interquartil das diferenças entre os grupos e avaliação pelo teste de Bonferroni's para dados não paramétricos. Onde $*P \leq 0,05$ e $**P \leq 0,001$ indicam significância entre o grupo G1000 e AC e G100 na fase subaguda da infecção 14 DPI e na fase crônica da infecção 42 DPI.

A análise do granuloma hepático não apresentou diferenças significativas entre os grupos de infecção e entre os tempos de análise da infecção (Gráfico 26B).

Além das análises semiquantitativas, foram realizados registros fotomicrográficos dos cortes histológicos hepáticos (Figura 18). Com isso, identificamos infiltrados inflamatórios e zonas de necrose (Figura 18 C e D), no grupo G100. No grupo G1000 foi identificado maior número de focos de infiltrado inflamatório, em comparação ao grupo G100, e zonas de necrose (Figura 19 E e F).

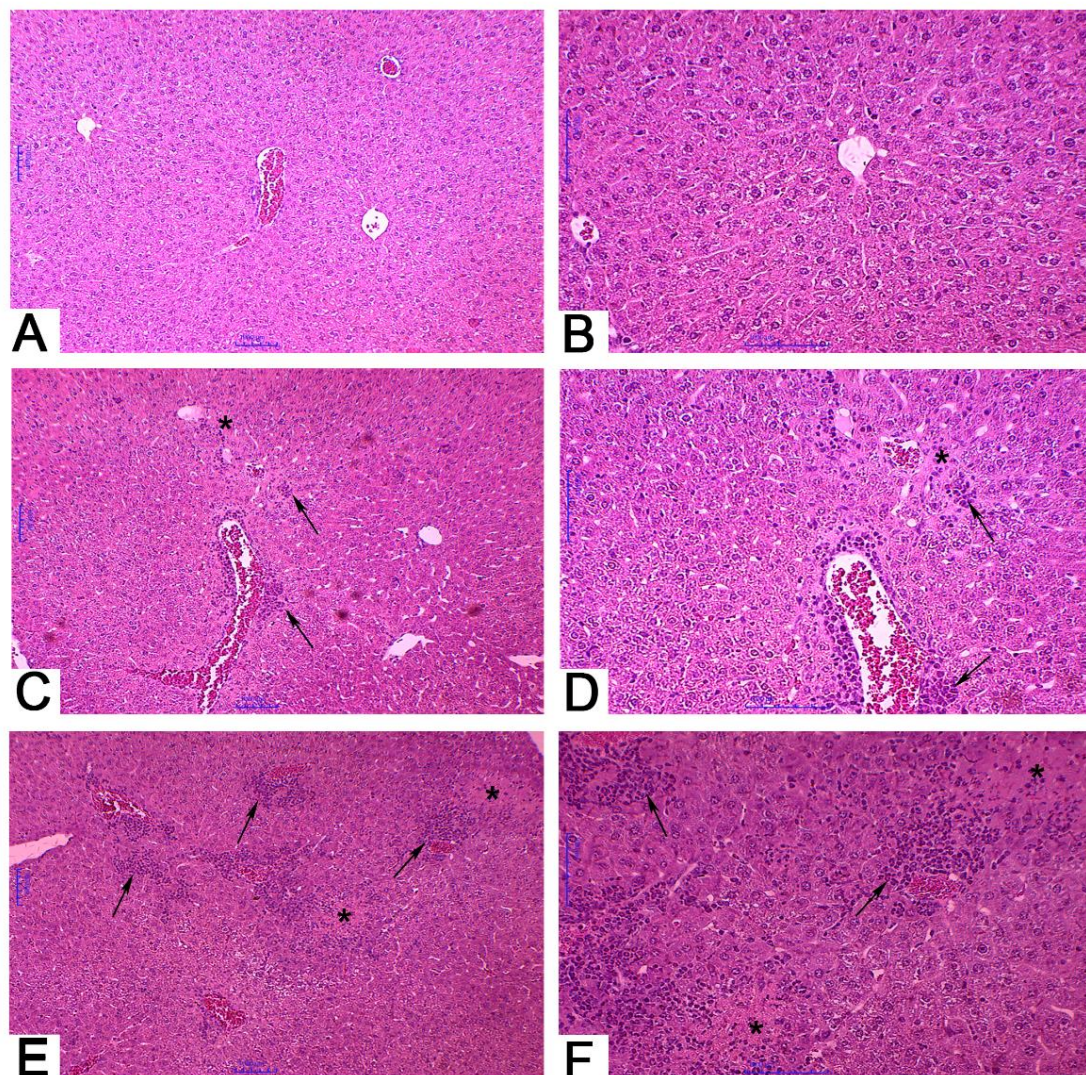


Figura 19: Fotomicrografia do fígado de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Grupo controle: Aspecto habitual do parênquima hepático. (B) Grupo controle: Maior aumento da imagem anterior. (C) Grupo G100: Imagem panorâmica do parênquima hepático apresentando infiltrado inflamatório (setas), zonas de necrose (*). (D) Grupo G100: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, infiltrado inflamatório (setas), zonas de necrose (*). (E) Grupo G1000: Imagem panorâmica do parênquima hepático apresentando aumento do número de focos de infiltrado inflamatório (setas) e zonas de necrose (*). (F) Grupo G1000: Maior aumento da imagem anterior exibindo detalhes, infiltrado inflamatório (setas), zonas de necrose (*). Barras = 1.000 μ m.

5.5.2. Histopatologia encefálica – Processamento tecidual em criomicrotomia com coloração de Nissl

Os encéfalos foram analisados por meio do processamento tecidual em criomicrotomia com coloração de Nissl, onde buscamos analisar as áreas (Figura 20) do córtex pré-frontal (Figura 20.1), amígdala (Figura 20.2), hipotálamo (Figura 20.3),

hipocampo dorsal (Figura 20.4), hipocampo ventral (Figura 20.5) e cerebelo (Figura 20.6).

Perante as análises realizadas verificamos que o emprego do corte histológico em criomicrotomia com aplicação da coloração de Nissl, não levou a percepção de alterações teciduais com presença de danos, como hemorragia por conta da passagem das larvas, e/ou larvas L3.

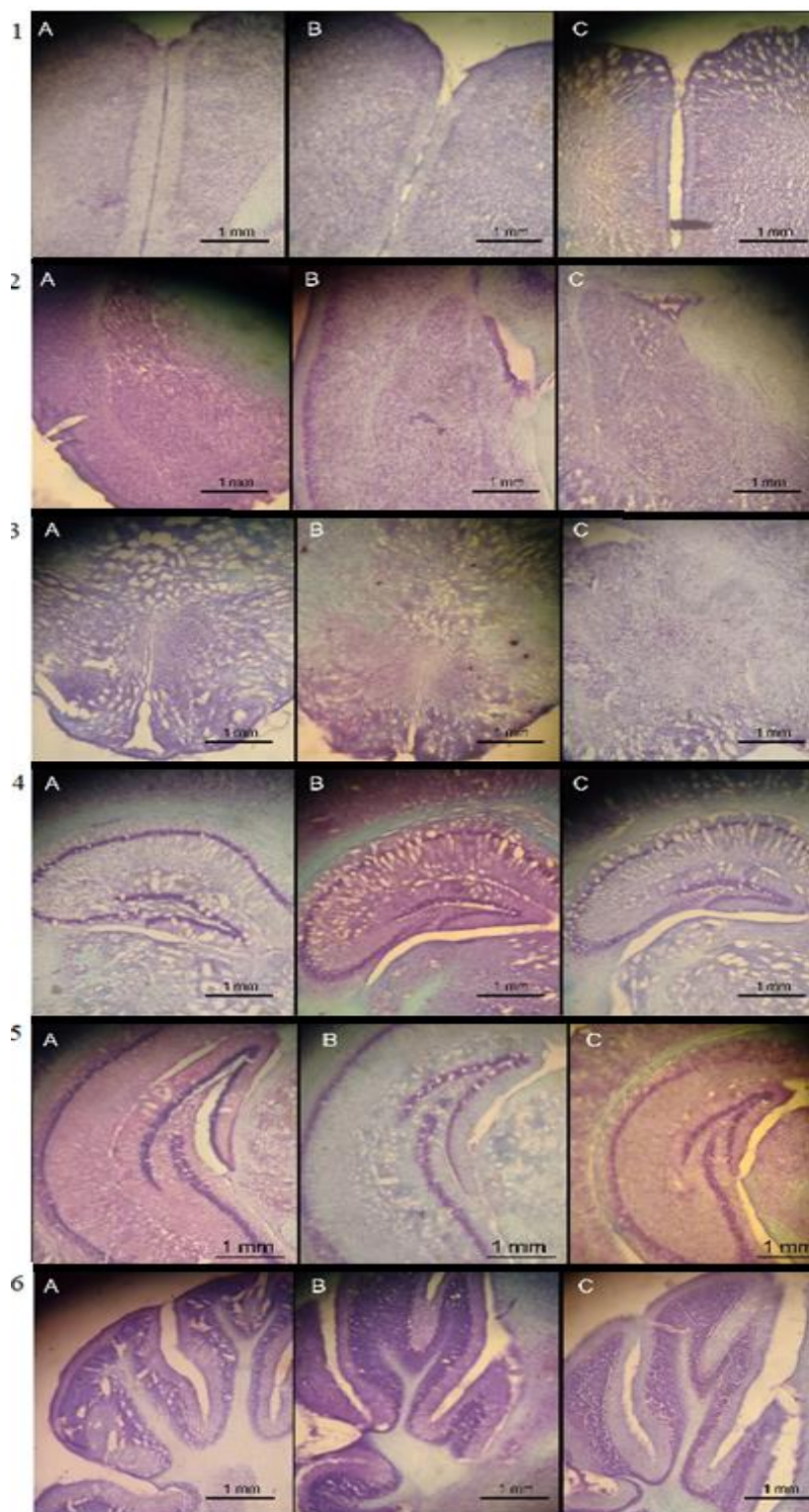


Figura 20: Fotomicrografia do encéfalo de camundongos BALB/c infectados com 100 e 1.000 ovos embrionados de *Toxocara canis*, necropsiados na fase subaguda da infecção 14 DPI e fase crônica da infecção 42 DPI. (A) Grupo de animais controle. (B) Grupo de animais infectados com 100 ovos embrionados, G100 (C) Grupo de animais infectados com 1.000 ovos embrionados, G1000.

1- Corte do córtex pré-frontal; 2- Corte da amígdala; 3- Corte do hipotálamo; 4- Corte do hipocampo dorsal; 5 - Corte do hipocampo ventral; 6- Corte do cerebelo.

Barras = 1 mm.

6. Discussão

Toxocara apresenta uma distribuição cosmopolita em hospedeiros definitivos canídeos e é um dos helmintos zoonóticos mais difundidos e prevalentes globalmente em hospedeiros paratênicos e acidental (Macpherson, 2013). Essa ocorrência demonstra que a toxocarose se encontra no mesmo nível que outras parasitoses de transmissão pelo solo, como por exemplo, a ascaridíase (Hotez, 2020; Papavasiliopoulos *et al*, 2018; Ma *et al*, 2017).

Com isso, o sucesso da toxocarose em se tornar um problema de saúde pública, negligenciado, está relacionado com alguns impulsionadores como o humano e os animais, o aquecimento global, a urbanização, os níveis populacionais elevados de hospedeiros, os fatores culturais, socioeconômicos e socioemocionais (Macpherson, 2013; Ma *et al*, 2017; Papavasiliopoulos *et al*, 2018; Hotez, 2020; Horowitz, 2021).

Além disso, devemos considerar que, mais da metade da população global possui um ou mais animais de estimação, estimando-se assim, que haja 470 milhões de cães de estimação no mundo (Jalongo, 2021). Desse total, pelo menos 100 milhões de cães estão infectados por *T. canis* no mundo (Rostami *et al*, 2020).

Ao pensarmos nesse total de cães infectados, e os correlacionarmos com os locais públicos, como parque, praias e playgrounds, encontramos uma taxa de contaminação desses locais por ovos de *T. canis* em torno de 21% de acordo com Rostami (*et al*, 2019).

A contaminação desses locais, e a passagem dos hospedeiros definitivos e paratênico pelo mesmo, faz com que haja outros ambientes contaminados, visto que, se constatou o albergar de ovos e larvas L3 em invertebrados como as baratas por exemplo, que são cosmopolitas e atuam como vetores mecânicos de diversos patógenos (Wu, Bowman, 2020; Bowman, 2020a).

A contaminação das baratas com os ovos larvados leva a uma transmissão mecânica, em que as fezes desses invertebrados contêm larvas e ovos de *T. canis*, que retornam para o ambiente, e assim podem dar continuidade ao ciclo, ou contaminar outros hospedeiros (Wu, Bowman, 2020; Bowman, 2020a).

Além dos invertebrados, há na literatura relato de outros hospedeiros vertebrados, além dos canídeos e o homem, como os lagomorfos, artiodátilos, aves, primatas e roedores, que ao se infectarem podem transmitir o patógeno para outros hospedeiros, auxiliando assim, na continuidade do ciclo biológico do parasito, ou infectando o hospedeiro acidental (Wu, Bowman, 2020; Bowman, 2020a), que apresenta uma soroprevalência de 19% em cenário mundial (Rostami *et al*, 2019).

Mas, mesmo com todo esse conhecimento em relação a epidemiologia da toxocarose, e suas possíveis formas de transmissão, há aspectos desafiadores em relação as rotas de migração tecidual e danos causados pela larva nos hospedeiros paratênicos e acidental (Holland, 2015). Logo, para entendermos melhor esse processo infeccioso, o uso do modelo experimental murino se faz necessário, visto que, o processo infeccioso de camundongos apresenta semelhança com a toxocarose dos hospedeiros paratênicos e acidental, principalmente (Resende *et al*, 2015; Holland, 2015).

Nesse contexto, a relevância desse estudo é representada pelo modelo experimental murino, como modelo de análise do impacto do *T. canis* na biologia e no comportamento do hospedeiro, pois a migração das larvas apresenta rota em tecido somático com predileção aos pulmões, músculos esqueléticos, rins, fígado, coração e cérebro (Schnieder, Laabs e Welz, 2011).

Logo, devemos entender que, a migração das larvas de *T. canis* nos hospedeiros paratênicos é dividida por três fases. A primeira é a fase aguda, que dura do dia 0 ao 13º dia após a infecção, equivalendo a fase hepato-pulmonar encontrada no hospedeiro definitivo, na qual ocorre penetração das larvas na parede intestinal e migração, por meio do sistema circulatório para o fígado, os pulmões e os tecidos somáticos. A segunda fase é a subaguda, que dura do 14º ao 27º dia após infecção, nessa fase ocorre migração progressiva e acúmulo de larvas, que acarretam em alterações comportamentais e ocorrência de reações inflamatórias no encéfalo dos hospedeiros paratênicos e acidental. A terceira fase é a fase crônica, que dura do 28º dia após infecção em diante, e ocorre retomada da migração larval (Strube, Heuer, Janecek, 2015; Strube *et al*, 2020).

A partir do conhecimento sobre essas fases da infecção, buscamos em nosso estudo, por meio de testes psicobiológicos, observar todas as fases após estabelecimento da infecção. Com isso, realizamos recuperação larval, caracterização dos aspectos inflamatórios da infecção e avaliação dos aspectos fisiopatológicos por meio da histopatologia albergando em específico, a fase subaguda e crônica da infecção.

Assim, a análise do processo infeccioso por meio da recuperação de larvas L3 na fase subaguda e crônica da infecção, buscou trazer entendimento sobre a migração larval, por meio da recuperação de larvas do fígado, pulmões e encéfalo, que foi subdividido em cérebro e cerebelo.

Dessa recuperação observamos que o grupo G100, não apresentou recuperação de larvas L3 em nenhum dos tecidos analisados, equiparando nossos achados com os de Camparoto (*et al*, 2008), que realizou inoculação de 200 ovos larvados em fêmeas

BALB/c com idade entre 4 e 6 semanas, e também não recuperou larvas na fase subaguda da infecção, especificamente no 15º dia após infecção, nas análises do fígado, dos pulmões e do encéfalo. Já na fase crônica da infecção, especificamente no 30º dia após infecção, os autores encontraram uma porcentagem média de 3% de larvas nos pulmões e encéfalo, divergindo do nosso estudo, que não apresentou recuperação larval na fase crônica no grupo infectado com 100 ovos larvados.

Ao analisarmos tais achados, os comparando com os achados desse estudo, devemos considerar variações do desenho experimental do grupo G100, assim como as diferenças existentes quanto ao método empregado para a cultura de ovos larvados, o tempo de cultura antes da inoculação, a quantidade de ovos larvados inoculados, a idade dos animais, e a retomada da migração larval na fase crônica da infecção para outros tecidos.

Na recuperação de larvas do grupo G1000, foram encontradas larvas L3 no fígado de dois animais, apresentando cada 1 larva L3, na fase subaguda da infecção. Tais achados divergem dos de Resende (*et al*, 2015), que utilizou fêmeas BALB/c de 8 semanas de vida inoculadas com 1.000 ovos larvados, e não recuperou larvas L3 do fígado, mas houve recuperação de larvas dos pulmões nessa fase da infecção.

Já no trabalho experimental realizado por Leal-Silva (2021), que utilizou fêmeas BALB/c de 8 semanas de vida inoculadas com 1.000 ovos larvados, foram recuperadas larvas do fígado e dos pulmões na fase subaguda da infecção, demonstrando haver variação na recuperação de larvas em diferentes experimentos, mesmo ocorrendo semelhança entre os desenhos experimentais.

Nossa recuperação de larvas no encéfalo apresentou números menores de larvas L3 do que foi encontrado na fase subaguda da infecção por Resende (*et al*, 2015) e Leal-Silva (2021), que encontraram uma recuperação mínima de 10 larvas chegando a ± 30 larvas máximas recuperadas, enquanto que, recuperamos um mínimo de 2 larvas L3 chegando ao máximo de 12 larvas L3.

Ao compararmos a recuperação de larvas L3 no encéfalo com os achados de Camparoto (*et al.*, 2008), no seu inoculo de 1.000 ovos larvados, verificamos que na fase subaguda da infecção a porcentagem média de larvas recuperadas foi maior que a porcentagem média de larvas recuperadas na fase crônica da infecção, resultado esse que diverge do nosso, visto que, recuperamos uma porcentagem média de 6,1% de larvas L3 no tempo 14DPI fase subaguda da infecção.

Já no tempo 42DPI fase crônica da infecção, encontramos uma porcentagem média de 8,8% de larvas L3 recuperadas no tempo 42DPI fase crônica da infecção, havendo assim, uma maior recuperação de larvas na fase crônica da infecção do que na fase subaguda.

Nossos achados são compatíveis com os de Janecek (*et al*, 2014), que fez uso do método de digestão tecidual em seu estudo com camundongos C57BL/6 infectados com 2.000 ovos de *T. canis*, e encontrou uma maior taxa de larvas L3 na fase crônica da infecção do que na fase subaguda.

Já nossa divisão do encéfalo em cérebro e cerebelo, apresentou uma maior porcentagem de larvas recuperadas no cérebro na fase crônica da infecção do que na fase subaguda da infecção, enquanto que, no cerebelo encontramos na fase subaguda uma quantidade maior de larvas do que na fase crônica da infecção.

Nossos achados são corroboráveis com os de Janecek e colaboradores (2014), que encontraram uma distribuição de larvas L3, em camundongos C57BL/6 infectados com 2.000 ovos de *T. canis*, maior no cérebro do que no cerebelo. Ocorrendo na fase crônica uma recuperação maior que na fase subaguda no cérebro, enquanto que no cerebelo foi encontrada uma porcentagem maior de larvas recuperadas na fase subaguda da infecção do que na fase crônica da infecção.

Esses achados podem estar correlacionados, há preferência que as larvas L3 apresentam pela substância branca cerebral. Isso possivelmente ocorre por conta da vantagem nutricional oferecida pela mielina, e/ou por esse ser um caminho que apresenta menor resistência no encéfalo (Hamilton *et al*, 2006; Janecek *et al*, 2017).

Com isso, em âmbito geral quanto a nossa recuperação larval, devemos considerar alguns fatores que podem ter acarretado em baixa recuperação do grupo G100, como a eclosão insuficiente dos ovos larvados na região estomacal e a constituição do pH estomacal dos animais.

Sabemos que além desses fatores devemos considerar, a quantidade de ovos larvados inoculados e os níveis crescentes de IL-6, durante os três primeiros dias da fase aguda da infecção, como descrito por Resende (*et al*, 2015). Esse fator, pode ter acarretado em um impedimento da entrada das larvas na circulação sistêmica, sendo então levadas essas a realizarem a primeira rota de migração, adentrando novamente no sistema digestivo e sendo eliminadas junto as fezes. Além disso, sabemos que as larvas podem ser encontradas no tecido muscular esquelético, sendo recuperando por Janecek (*et al*, 2014) um total de 50% larvas em seu estudo.

Em estudo realizado por Ruiz-Manzano (*et al.*, 2019), com BALB/c inoculados com 500 ovos larvados, foram encontrados, após o encéfalo, um maior número de larvas no tecido muscular na fase crônica da infecção. E por fim, devemos considerar a migração progressiva e o acúmulo de larvas, na fase subaguda, com a retomada da migração larval na fase crônica da infecção, como fatores que influenciaram nossos achados.

Logo, para entendermos um pouco mais sobre os efeitos temporais da migração larval sobre os animais, realizamos análises do estado fisiológico dos animais por meio de uma análise comparativa temporal do peso corporal dos animais, comparando animais infectados entre os tempos de infecção com os animais controle.

A análise do peso dos animais infectados foi realizada anteriormente por Epe e colaboradores (1994) com camundongos BALB/c fêmeas, que apresentaram de 6 a 8 semanas de vida e foram infectados com 1.000 ovos larvados. Esses animais apresentaram diminuição no número médio de larvas recuperadas durante a fase subaguda em comparação com a fase aguda, ocorrendo um aumento do peso em acordo com o percurso do processo infeccioso.

Ao olharmos para o aumento de peso dos animais de acordo com o percurso da infecção, verificamos divergência em outras infecções helmínticas que chegam ao sistema nervoso central, como é demonstrado no trabalho de Jhan e colaboradores (2020) com inóculos de 50 larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* em animais BALB/c e C57BL/6.

Jhan (*et al.*, 2020) encontrou diminuição do peso dos animais a partir do 14º dia após infecção, relacionando seu achado ao desenvolvimento dos vermes em adultos jovens no encéfalo dos animais. Causando assim, uma inflamação tecidual encefálica no hospedeiro com mudança de comportamento e mortalidade a partir do 21º dia após infecção.

Com isso, ao olharmos para esses dois estudos, verificamos uma diferença existente entre ganho e perda de peso dos animais em relação as infecções, aparentando ser o desenvolvimento larval, junto a mudança de estágio do parasito dentro do encéfalo, o diferencial entre as infecções. Além disso, devemos considerar no hospedeiro dois tipos de mecanismos de defesa que o hospedeiro pode evoluir quando desafiado por um patógeno, sendo eles a resistência e a tolerância (Schnieder e Ayres, 2008).

Na resistência se espera que o hospedeiro e o patógeno apresentem uma coevolução antagônica em que, ao evoluir resistência por parte do hospedeiro, o

patógeno acaba por evoluir de maneira a subverter essa resistência, acabando por conduzir a seleção natural de mecanismos de resistência do hospedeiro (Schnieder e Ayres, 2008).

Já a tolerância, busca aliviar a gravidade da doença, acarretando em um efeito neutro ou positivo sobre o patógeno, pois os hospedeiros tolerantes podem viver mais, aumentando assim, a prevalência da doença e potencializando a propagação do parasito (Schnieder e Ayres, 2008).

Essa evolução da resistência, entre o hospedeiro e o patógeno, possivelmente está relacionada com a migração larval e a resposta pró-inflamatória desencadeada durante a infecção por *T. canis*. Assim, a quebra da resistência pelo *T. canis*, durante os processos de migração larval, levando o parasito a adentrar no sistema nervoso central, de onde é possível realizar manipulações do comportamento do hospedeiro, podem acarretar na presença das larvas no sistema límbico, mas não ocorrendo presença larval na região do hipotálamo, como foi observado por Springer (*et al*, 2019), em 5 animais C57BL/6 inoculados com 2.000 ovos larvados, em que apenas 1 animal na fase subaguda e 1 animal na fase crônica apresentaram larvas nessa região.

Sabemos que essa região do sistema límbico é importante no controle da ingestão alimentar, mas tal confirmação, seria encontrada pela análise histopatológica do tecido encefálico, já que encontramos no hospedeiro médias de peso equiparadas aos do grupo controle. Com isso, possivelmente por conta da tolerância, e a não migração larval para a região do hipotálamo, o hospedeiro foi levado a um ganho de peso, dentro da linha normal para camundongo, sendo eles possivelmente influenciados pelo ciclo biológico do parasito, visto que, esse ganho pode auxiliar para que o animal seja predado com mais facilidade pelo hospedeiro definitivo.

Além disso, sabemos que a infecção por *T. canis* apresenta uma ação patogênica com os produtos excretores e secretores das larvas, logo, há ativação e modulação do sistema imune do hospedeiro, levando a sobrevivência das larvas por meses ou anos no hospedeiro (Ruiz-Manzano *et al.*, 2019). Com isso, a preservação do peso no animal se torna crucial, pois com isso o animal consegue ter os elementos nutricionais necessários para sobrevivência das larvas L3 e aumento das chances de continuidade do ciclo biológico parasitário, fato esse diferente do que ocorre no estudo descrito por Jhan (*et al*, 2020) com as larvas de *Angiostrongylus cantonensis*, pois há completude do ciclo no hospedeiro murino.

Na busca por mais entendimento sobre o efeito do processo infeccioso, e a migração larval, utilizamos além da recuperação larval nos tecidos e da análise do peso

dos animais, análises psicobiológico da infecção por meio de testes comportamentais. Os testes comportamentais foram aplicados temporalmente nas fases aguda, subaguda e crônica da infecção por *T. canis*, logo, analisamos nos diferentes tempos da infecção os comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo dos animais, por meio dos testes de Neofagia e Nado Forçado.

O teste da neofagia – *novelty suppressed feeding* diz da supressão da alimentação por conta da novidade que o ambiente traz para o animal, sendo utilizado como forma de avaliar o comportamento ansioso do animal. Hall em 1934 observou correlação negativa entre a defecação e alimentação quando o roedor é exposto a um ambiente novo. Em estudos posteriores na década de 1970, se confirmou que a hiponeofagia e defecação atenuavam-se com exposição repetidas vezes do animal a esse ambiente, além de concluir que a intensidade da iluminação torna o ambiente mais ansiogênico para o animal (Samuels e Hen, 2011).

Experimentos psicobiológicos, quanto a análise do comportamento tipo ansioso foram utilizados por Cox e Holland (2001b) em estudo com camundongos inoculados com três cargas parasitárias distintas de *T. canis*, 100, 1.000 e 3.000 ovos larvados. Os autores buscaram por meio do experimento do Labirinto em T e Labirinto em Cruz Elevado a correlação entre ansiedade e exploração.

No Labirinto em T, ocorreram níveis menores de exploração pelos camundongos infectados, e quanto maior o número de ovos inoculados, menor foi a exploração, apresentando esse teste a ocorrência do comportamento ansiogênico nos animais. Mas em contrapartida, no Labirinto em Cruz elevado, os camundongos apresentaram um comportamento ansiolítico em relação a áreas aversivas, principalmente nos animais inoculados com 1.000 e 3.000 ovos. Tais achados demonstram que níveis de inoculação baixos não alteram a exploração do animal ao ambiente, levando o mesmo a apresentar o comportamento tipo ansiolítico enquanto níveis elevados de inoculo, acarretam no hospedeiro baixa exploração do ambiente e presença do comportamento tipo ansiogênico (Cox e Holland, 2001b).

Diferente do Labirinto em Cruz e o Labirinto em T, que se baseiam em padrões etológicos típicos dos roedores, como a exploração em ambiente aversivo, o teste de Neofagia, alimentação suprimida por novidade, busca avaliar o comportamento tipo ansioso/ansiogênico (Samuels e Hen, 2011; Powell, Fernandes e Schalkwyk, 2012; Blasco-Serra, *et al.*, 2017).

Para avaliar tal comportamento, em roedores, o teste busca analisar o comportamento tipo ansiogênico em uma situação de conflito, entre a recompensa alimentar e a exploração do ambiente aversivo, criando-se um fator compensatório para o animal enfrentar o ambiente ansiogênico. Assim, buscamos com o teste de Neofagia analisar parâmetros como o peso dos animais após o jejum alimentar, a quantidade de ração ingerida e o tempo de latência para a primeira alimentação, que melhor explicariam o comportamento tipo ansioso dos animais (Samuels e Hen, 2011; Powell, Fernandes e Schalkwyk, 2012; Blasco-Serra, *et al.*, 2017).

Com isso, a comparação entre a média de peso dos animais antes e após o jejum, apresentou no grupo dos animais infectados uma predominância na diminuição do peso médio dos animais após o jejum. Já, na comparação entre grupo controle e animais infectados, encontramos predominância na diminuição de peso após o jejum. Logo, a diminuição de peso após o jejum foi fator crucial para o teste, visto que, leva o animal ao conflito de explorar ou não o ambiente em busca da recompensa alimentar que é fisiologicamente necessária.

Dentro dos resultados obtidos quanto ao peso dos animais antes e após o jejum, chama a atenção o tempo 7DPI (fase aguda da infecção), em que observamos alterações no peso do grupo G100 e seu controle, com aumento na média de peso após o jejum. Possivelmente, esse achado está relacionado com a entrada dos animais em jejum alimentar por 17 horas, posterior liberação de comida pela manhã por 6 horas, pois o teste não foi aplicado, e início de um novo processo de jejum dos animais.

Além da comparação do peso dos animais antes e após o jejum, foi realizada a comparação da quantidade de ração ingerida entre os controles e os grupos de infectados. Essa análise apresentou na fase aguda, no grupo G100 um comportamento tipo ansiolítico com uma ingestão maior de alimento, e o grupo G1000 um comportamento tipo ansiogênico com uma ingestão menor de alimento.

Na fase subaguda, encontramos no grupo G100 uma ingestão menor de ração, ocorrendo um comportamento tipo ansiogênico, e no grupo G1000 encontramos um comportamento tipo ansiogênico com uma ingestão menor de ração. Já na fase crônica, encontramos no grupo G100 uma quantidade de ração ingerida maior, ocorrendo um comportamento tipo ansiolítico, e no grupo G1000 encontramos um comportamento tipo ansiogênico com uma quantidade de ração ingerida menor.

Nossos achados apresentam uma predominância do comportamento tipo ansiolítico no grupo G100 em comparação ao controle, enquanto o grupo G1000

apresentou comportamento ansiogênico. Esses resultados podem estar correlacionados com a diferença entre os inóculos de ovos larvados, assim como a migração das larvas L3 e os danos teciduais causados por elas, ocorrendo possível influência do comportamento tipo ansiolítico/ansiogênico por conta do encapsulamento das larvas no tecido encefálico.

Complementando nossos achados com o teste de Neofagia, realizamos análise temporal dos grupos em relação a quantidade de ração ingerida, e encontramos um aumento na quantidade de ração ingerida do grupo G100 durante o percurso da infecção. Esse achado possivelmente está relacionado ao número de ovos inoculados, pois no grupo G1000 encontramos um aumento seguido por diminuição na fase crônica, que possivelmente está correlacionado ao número de ovos larvados inoculados e a retomada da migração larval, que acarretou possivelmente na migração das larvas para a região encefálica, como constatado na recuperação larval.

Com isso, quando realizamos a comparação entre os grupos de animais infectados, encontramos um comportamento tipo ansiolítico nos animais G100 e um comportamento tipo ansiogênico nos animais G1000.

Mas além dessas análises, realizamos também análise em relação ao tempo de latência para a primeira alimentação, comparando os grupos de infectados com o grupo controle. Logo, encontramos em todas as fases um tempo menor de latência para a primeira alimentação no grupo G100, salvo o tempo 7DPI, no qual os animais eutanasiados no tempo 14DPI, apresentaram uma média maior que os animais controle, levando esses animais ao comportamento tipo ansiolítico.

Diferente do comportamento ansiolítico encontrado no grupo G100, encontramos no grupo G1000 um aumento na latência para a primeira alimentação nas fases aguda e crônica, com posterior diminuição na fase subaguda, demonstrando assim, que o grupo G1000 apresentou um comportamento tipo ansiogênico seguido por um comportamento ansiolítico. Esse achado, da fase subaguda, possivelmente está relacionado com o miotropismo e neurotropismo das larvas L3 e as alterações comportamentais causadas por essas larvas, visto que, o inóculo maior torna a infecção mais intensa.

Assim, para nossos achados devemos levar em conta a quantidade de ovos inoculados em cada grupo, e as diferenças entre os ambientes, pois os animais foram testados em locais distintos, havendo no ambiente de teste do grupo G1000 luminosidade artificial e natural do dia, temperatura ambiente e circulação de ar realizada por janelas. Já no ambiente do grupo G100, a luminosidade foi apenas artificial e houve uso do ar condicionado. Tais diferenças foram observadas nos animais controle também.

Nossos achados corroboram com os de Cox e Holland (2001b) que observaram correlação com o número de ovos inoculados e o comportamento tipo ansiolítico e ansiogênico, já que, cargas menores levaram os animais a apresentarem comportamento tipo ansiolítico e cargas maiores ao comportamento tipo ansiogênico, salvo a fase aguda do grupo G100 em que encontramos o comportamento ansiogênico.

Já o teste do nado forçado – *forced swim test*, Porsolt *forced swimming test* ou *behavioural despair test*, elaborado por Porsolt, Le Pichon e Jalfre (1977) para ratos, e posteriormente modificado por Porsolt, Bertin e Jalfre (1977) para camundongos, nos levou a observar o comportamento de roedores quando são forçados a nadar em uma situação na qual não podem escapar.

Esse teste leva os animais a apresentarem um comportamento de imobilidade após um período de atividade vigorosa, fazendo apenas movimentos para manter sua cabeça acima da água (Porsolt, Le Pichon e Jalfre, 1977). Com isso, o teste é embasado no comportamento de imobilidade que o animal adota após inúmeras tentativas de escapar da situação, sendo a imobilidade interpretada como forma de desamparo/desespero frente a situação na qual não é possível escapar, tal comportamento é equiparado a alguns sinais da depressão humana (Funchal e Dani, 2014).

A análise do comportamento de desamparo/desespero em infecções parasitárias que atingem o sistema nervoso central e apresentada na literatura por três artigos que relatam a aplicação desse teste. Nesses trabalhos, as infecções analisadas foram causadas por protozoários e helmintos que apresentam níveis altos de morbidade e mortalidade em animais experimentais, além disso, nos testes o tempo total foi de 6 minutos, mas a análise do comportamento ocorreu apenas nos 4 minutos finais do teste em todos os trabalhos.

Um dos trabalhos foi elaborado por Vilar-Pereira e colaboradores (2012), que analisaram camundongos C3H/He inoculados com *Trypanosoma cruzi*, e encontraram tempos maiores de imobilidade nos animais infectados, demonstrando esses um comportamento tipo depressivo.

Enquanto o trabalho de Jhan e colaboradores (2020), aplicou o teste do nado forçado em camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados com *Angiostrongylus cantonensis*, encontrando tempos maiores de imobilidade nos animais BALB/c, demonstrando esses animais o comportamento tipo depressivo, e encontrou-se tempos menores de imobilidade nos animais C57BL/6, que não demonstraram o comportamento tipo depressivo.

O teste também foi realizado por Castaño-Barrios e colaboradores (2021), em

camundongos C57BL/6 infectados com *Toxoplasma gondii*. Nesse estudo, encontrou-se diminuição no tempo de imobilidade dos animais de acordo com o tempo de progressão da infecção.

Na análise da latência para o primeiro episódio de imobilidade, quando comparamos grupo de infectados e grupo controle, encontramos tempos menores no grupo G100 e maiores no grupo G1000 do que no grupo controle. Enquanto, na comparação dos grupos entre si, vemos em ambos os grupos uma diminuição no tempo de latência em acordo com o curso da infecção. Já na comparação entre os grupos de infectados, vemos tempos de latência menores no grupo G1000.

Nossos achados nos levam a concluir que há um comportamento tipo depressivo no grupo G100 e não depressivo no grupo G1000, quando esses grupos são analisados em comparação ao grupo controle. Mas quando realizamos uma análise temporal encontramos ambos os grupos de infectados apresentando o comportamento tipo depressivo, aumentando esse comportamento em acordo com o percurso da infecção. Mas, quando comparamos os grupos de infectados entre si, vemos que o grupo G1000 apresenta o comportamento tipo depressivo.

Além da latência para o primeiro episódio de imobilidade, analisamos os comportamentos de imobilidade e mobilidade, tendo a perspectiva de proporcionalidade entre os comportamentos. Logo, ao compararmos controle com infectados, encontramos um comportamento de imobilidade maior no grupo G100 e menor no grupo G1000 em todos os tempos, nos levando a hipótese de que os animais G100 apresentam o comportamento tipo depressivo e os animais G1000 o comportamento antidepressivo. Mas, encontramos um comportamento de mobilidade maior em ambos os grupos de infectados quando esses são comparados ao controle, acarretando nos animais infectados um comportamento antidepressivo.

Com isso, devemos considerar não somente fatores do ambiente físico, como já citados, mas fatores como temperatura da água e fatores hormonais dos animais, não testados nesse trabalho, que podem ter levado a esse resultado, visto que os animais analisados eram fêmeas.

Na comparação consigo mesmo, quanto a imobilidade vemos no grupo G100 e G1000 uma diminuição no tempo de imobilidade na fase subaguda, demonstrando um comportamento antidepressivo, mas ocorreu um aumento do tempo de imobilidade na fase aguda e crônica, demonstrando um comportamento depressivo dos animais. Já na mobilidade percebemos em ambos os grupos um aumento na fase subaguda e diminuição

na fase aguda e crônica.

Esses achados demonstram que o estabelecimento das larvas L3 no encéfalo na fase aguda, como a retomada de migração na fase crônica, levam os animais, independentemente, da quantidade de ovos larvados inoculados a apresentarem o comportamento tipo depressivo, apresentando uma progressão no quadro em acordo com o percurso da infecção.

Quando comparamos os grupos de infectados com o controle, percebemos um maior tempo de mobilidade dos animais infectados, demonstrando assim um comportamento antidepressivo, enquanto os controles apresentaram menor tempo de mobilidade e um comportamento depressivo. Mas, percebemos nos animais G1000, eutanasiados no tempo 42DPI, um tempo de imobilidade maior em relação ao grupo controle, levando esses animais a terem um comportamento tipo depressivo, e levando a hipótese de que, quanto maior o tempo de infecção mais nítido fica o comportamento depressivo dos animais.

Ao olharmos para todos os testes empregados, análises realizadas, fatores ambientais, fatores hormonais dos animais e fatores do próprio testes, encontramos a necessidade do emprego de mais testes psicobiológicos, com mesmo enfoque do comportamental, e o emprego de outras técnicas de análise advindas da neurofisiologia e histopatologia para melhor entendermos os processos tipo ansioso e tipo depressivo durante o percurso temporal da infecção causada por *T. canis*.

Mas, dentro desse estudo ao buscarmos melhores entendimentos do processo infeccioso, principalmente em relação ao grupo G100, em que não foram recuperadas larvas, realizamos também análises quanto aos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como marcadores da infecção, de maneira a auxiliar no entendimento do processo infeccioso.

Com isso, sabemos que o processo infeccioso causado por helmintos intestinais apresenta um processo inflamatório mediado pelo epitélio intestinal, que determina o desenvolvimento da resposta Th2 e ativação da resposta Th1 em associação com a cronicidade da infecção. Com a liberação de citocinas, que derivam do epitélio intestinal, há ativação de várias células imunes inatas que antecipam e iniciam a resposta Th2, contribuindo para seu reforço durante o processo infeccioso (Allen e Maizels, 2011; Cortés *et al*, 2017).

Após o desenvolvimento da resposta Th2 há ativação da resposta Th1 durante a infecção helmíntica, sendo essa uma resposta inata que apresentam níveis elevados de

citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12, buscando algumas delas benefícios para o hospedeiro na tentativa de expulsar o patógeno, e outras, como a IL-12, realizam uma função contrária, com a regulação negativa da resposta Th2 intestinal, podendo atuar na promoção da sobrevivência do parasito (Cortés *et al.*, 2017; Waindok e Strube, 2019).

A atuação das citocinas pró-inflamatórias podem estar correlacionadas aos mecanismos de resistência e tolerância entre hospedeiro e patógeno, o qual com a evolução da resistência do hospedeiro busca ser subvertido pelo patógeno, sendo no caso do *T. canis*, por meio dos seus produtos excretores-secretoras (TES) das larvas (Schneider e Ayres, 2008; Ruiz-Manzano *et al.*, 2019).

Outra citocina pró-inflamatória é a IFN- γ , que apresenta níveis elevados principalmente em infecções parasitárias intracelulares causadas por protozoários, como a *Leishmania* e *Plasmodium*, havendo apenas algumas exceções em relação as infecções helmínticas (Weatherhead *et al.*, 2020). Além disso, durante o processo infecciosos, os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias da resposta Th1 e inata podem acarretar danos ao hospedeiro, como lesões neuronais e até mesmo problemas neurodegenerativos (Waindok e Strube, 2019).

Logo, em busca de diminuir os danos para os hospedeiros, as infecções helmínticas intestinais apresentam predominância da resposta Th2, ocorrendo durante a fase aguda da infecção a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que primeiro ocorre por linfócitos inatos e posteriormente por antígenos efetores específicos das células CD4 T (Cortés *et al.*, 2017; Gazzinelli-Guimaraes e Nutman, 2018). Dessas citocinas, chama atenção as interleucinas IL-4 e IL-13, que por meio do receptor alfa da cadeia de IL-4, se ligam a várias células imunes e não imunes ativando mecanismos efetores em busca de expulsar o patógeno (Cortés *et al.*, 2017).

Além da busca em expulsar o patógeno, encontramos a predominância da resposta Th2 ao longo da infecção helmíntica, possivelmente, como marcador de cronicidade da infecção, induzindo a expansão das células Tregs, e modulando de maneira significativa a resposta Th1, com alteração dos níveis de IL-2 e IFN- γ (Cortés *et al.*, 2017 Gazzinelli-Guimaraes e Nutman, 2018).

Na infecção por *T. canis* encontramos o desencadear da resposta Th2, que leva a baixa modulação da resposta Th1 e da resposta inata, ocorrendo uma diminuição na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ , com concomitante

produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Resende *et al*, 2015; Ruiz-Manzano *et al.*, 2019).

Além disso, encontramos na infecção por esse parasito, uma ação patogênica correlacionada aos produtos excretadores-secretadores (TES) das larvas, que ativam e modulam o sistema imune do hospedeiro, acarretando na sobrevivência das larvas por meses ou anos (Ruiz-Manzano *et al.*, 2019). Com isso, sabemos que durante a fase aguda da infecção, período de migração larval, Resende (*et al*, 2015) encontrou, em BALB/c inoculados com 1.000 ovos embrionado, uma resposta inflamatória inata, Th2 e Th17 com aumento significativo e gradativo até o 7º dia de infecção de IL-5 e IL-6, com pico no 3º de infecção, e níveis de IL-4, IL-13 e IL-17, que apresentaram aumento significativo na fase subaguda da infecção, e sem diferenças nas produções de TNF- α e IFN- γ em relação aos animais controle.

Já Waindok e Strube (2019), em seu estudo com camundongos C57BL/6 inoculados com 2.000 ovos larvados, ao analisar as citocinas em tecido cerebral e cerebelar encontrou níveis significativamente reduzidos da citocina pró-inflamatória TNF- α durante o percurso do estudo no cérebro, e diminuição cerebelar de citocinas como IL-3, IL-6 e IL-9 na fase crônica da neurotoxocarose.

Nossas análises não foram realizadas no tecido encefálico e sim em material sorológico, logo os níveis séricos de IL-6 não apresentaram resultados significativos em nenhuma das análises realizadas. Esses achados apresentam explicação no estudo de Resende (*et al*, 2015), que informa haver um pico de IL-6 no 3º dia após infecção, com diminuição progressiva da mesma até o 14º dia após-infecção, momento inicial da fase subaguda da infecção, tempo esse em que encontramos níveis séricos não significativos de IL-6 em ambos os grupos de infectados. E no estudo de Waindok e Strube (2019) que encontrou significância de IL-6 no tecido encefálico na fase crônica da infecção, a partir do 42º dia após infecção em diante, mesmos esses níveis apresentando diminuição progressiva, como descrito por Resende (*et al*, 2015), na fase subaguda da infecção.

Ao analisarmos ambos os estudos, concluímos que os níveis de IL-6 encontrados foram mais altos, ocorrendo esse elevar de níveis dosados na fase crônica da infecção, mas não ocorrendo significância quando comparamos os resultados com o grupo controle, de maneira temporal e entre os grupos de infectados.

Nosso estudo ainda demonstrou ocorrer diferenças desses níveis entre os grupos G100 e G1000 na fase subaguda da infecção, provavelmente por conta da diferença entre as cargas de inóculo que acarretou em mais larvas no grupo G1000 realizando a migração

neurotópica e miotópica. Quando observamos a fase crônica da infecção encontramos uma diferença média de 2 pg/ml nos níveis séricos de IL-6, demonstrando que mesmo não ocorrendo recuperação larval nos animais G100, os níveis séricos da citocina IL-6 possivelmente demonstram a ocorrência do processo infeccioso causada por *T. canis* no grupo G100.

Já a citocina TNF- α , que não apresentou diferenças no estudo de Resende (*et al.*, 2015), no estudo de Ruiz-Manzano (*et al.*, 2019), com inoculação de 500 ovos larvados em BALB/c, apresentou níveis séricos elevados de TNF- α , mas não significativos, e em níveis esplênicos foi encontrado níveis menores em comparação ao grupo controle na fase crônica.

Em nosso estudo, encontramos níveis séricos de TNF- α , em ambos os grupos de infectados, ocorrendo no grupo G100 uma diminuição de níveis séricos na fase crônica, quando comparamos com a fase subaguda, e aumento na fase crônica em comparação a fase subaguda no grupo G1000. Assim, nossos achados quanto ao grupo G100 se equiparam com os de Waindok e Strube (2019), mas nossas dosagens, se apresentaram, em ambos os grupos de infectados, significativamente menores. Tais achados, possivelmente, apresentam relação com a cepa e a quantidade de ovos inoculados.

Nossos achados, quanto as citocinas pró-inflamatórias chamam atenção, pois níveis elevados podem causar no hospedeiro lesões neuronais e até mesmo problemas neurodegenerativos (Waindok e Strube, 2019). Situação essa, possivelmente, não aplicável em nosso estudo, visto que, nossos níveis foram baixos.

Mas, sabemos que a migração larval na neurotoxocarose pode estar relacionada a distúrbios neurológicos e psiquiátricos como progressão de doenças neurodegenerativas, distúrbios neuropsicológicos como demência, depressão, ansiedade e esquizofrenia por conta da preferência das larvas pela substância branca encefálica (Ma *et al.*, 2017; Janecek *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Fan, 2020; Gale e Hedges, 2020). Com isso, além da dosagem de TNF- α , é importante a aplicação de testes psicobiológicos que testam a progressão de problemas neurodegenerativos e neuropsicológicos, além do uso de outros meios de análise para melhor compreensão dos danos teciduais e da migração larval.

Com isso, de forma a trazer mais entendimento aos nossos achados, realizamos dosagens da quimiocina pró-inflamatória CCL-17, que é encontrada em vários órgãos, como pulmões, fígado e pele, sendo sua indução dependente da presença de citocinas Th2, como a IL-4 e IL-13 (Jakubzick *et al.*, 2004).

Além disso, CCL-17 apresenta ser dependente da produção de IFN- γ pela resposta Th1, pois IFN- γ se apresenta como um potente estimulante para a produção de CCL-17 por células epiteliais brônquicas (Jakubzick *et al*, 2004). Possivelmente, na infecção por *T. canis* sua produção não possui correlação com IFN- γ , visto que, nos estudos de Resende (*et al*, 2015), Ruiz-Manzano (*et al.*, 2019) e Waindok e Strube (2019) não foram encontrados níveis séricos altos de IFN- γ , mas estudos específicos devem ser realizados para confirmar tal hipótese.

Sabemos que CCL-17, em infecções helmínticas humanas, é utilizado como marcador, sendo sua produção demarcada principalmente pela resposta imune Th2, estando presente em pacientes que apresentaram infecções por helmintos transmitidos pelo solo e por *Schistosoma mansoni* (Geiger *et al*, 2013).

No caso da esquistossomose, Castro (*et al*, 2018) não encontrou níveis séricos significativos nos pacientes com carga parasita baixa ou ultrabaixa, diferente do que é encontrado em cargas acima de 100 ovos por grama de fezes e coinfeções com geohelmintos. Já Miranda (*et al*, 2021), verificou níveis menores de CCL-17 em pacientes infectados por *S. mansoni* e com histórico de infecção por leishmaniose tegumentar americana, em comparação a pacientes que não apresentaram infecção anterior por leishmaniose.

No estudo experimental de Jakubzick (*et al*, 2004), com camundongos CBA/J inoculados com 3.000 ovos de *S. mansoni*, de forma intravenosa, observou-se que com a inumoneutralização da quimiocina CCL-17, os eosinófilos associados ao granuloma pulmonar apresentaram redução, e tal fato, possivelmente, apresenta relação as limitações que a quimiocina parece ter em relação a sua circulação, parecendo estar presente apenas na superfície endotelial dos vasos sanguíneos.

A infecção por *T. canis* apresenta níveis séricos de IL-4 e IL-13 significativo na fase aguda da infecção, enquanto a produção de IFN- γ não apresenta diferenças quando comparado aos animais controle, de acordo com o estudo de Resende (*et al*, 2015).

Já no estudo de Waindok e Strube (2019) IFN- γ apresentou diminuição contínua no cérebro durante o percurso da infecção, mas seus níveis no cerebelo apresentaram um leve aumento da fase aguda para a fase subaguda, havendo na fase crônica diminuição no 28º e 70º dia após infecção, seguido de aumento no 42º, tempo com nível mais elevado, e 98º dia após infecção. Já a citocina IL-4, apresentou aumento na fase aguda e subaguda, com pico no início da fase crônica, 28º dia após infecção, com posterior diminuição, enquanto que IL-13 se apresentou com níveis diminutos (Waindok e Strube, 2019). No

estudo de Ruiz-Manzano (*et al*, 2019), da fase crônica da infecção foram encontrados níveis aumentados de IL-4 e diminuídos de IFN- γ .

Em nosso estudo não analisamos as citocinas IL-4 e IL-13, e o IFN- γ , mas perante o cenário descrito quanto a produção de CCL-17, e a descrição da resposta Th1 e Th2 na infecção por *T. canis*, é possível compreender que, os níveis séricos encontrados da quimiocina CCL-17 apresentam produção relacionada a resposta Th2. Mas, são necessários mais estudos para entendermos o processo na infecção por *T. canis*, visto que diferenças entre os tempos dos grupos de infectados foram encontradas, ocorrendo níveis mais altos de CCL-17 na fase subaguda em comparação a crônica no grupo G100, e no grupo G1000 níveis mais altos na fase crônica em comparação a subaguda.

A recuperação larval apresentou-se com um número maior de larvas no tecido encefálico do grupo G1000 que, demonstrou, durante o percurso da infecção um comportamento tipo ansiogênico, mas ao compararmos com os estudos aqui citados, os níveis de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias foram menores, assim como no grupo G100, que apresentou um comportamento, predominante, do tipo ansiolítico. Com isso, as alterações encontradas até esse ponto do estudo, possivelmente apresentam correlação com a migração larval, não com os efeitos da resposta imune do organismo.

As análises dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, auxiliaram, na conclusão de que os animais G100 passaram por um processo infeccioso durante o estudo, possivelmente causado pela inoculação de ovos larvados de *T. canis*, havendo necessidade de mais avaliações do sistema imune, abordando outros marcadores de níveis séricos, marcadores teciduais da infecção, e/ou o uso de testes diagnósticos utilizando os produtos TES da larva, além de análises histológicas e de imagem para confirmação da infecção.

Nossas análises passaram por recuperação de larvas dos tecidos, análise do peso dos animais, análises psicobiológicas e análises dos níveis séricos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, e de maneira a fechar nossos estudos, realizamos por fim, a identificação de alterações patológicas na infecção por meio da descrição de aspectos histopatológicos nas fase subaguda e crônica da infecção por *T. canis*.

A fase aguda da infecção em modelo experimental, equivale a fase hepatopulmonar encontrada no hospedeiro definitivo, na qual ocorre penetração das larvas na parede intestinal e migração, por meio do sistema circulatório para o fígado, os pulmões e os tecidos somáticos. Após essa fase, na fase subaguda as larvas realizam migração por todo o corpo do hospedeiro havendo predileção por alguns tecidos, como pulmões,

músculos esqueléticos, fígado e cérebro. (schnieder, Laabs e Welz, 2011; Strube, Heuer, Janecek, 2015; Strube *et al*, 2020). Assim, por entendermos o processo de miotropismo e neurotropismo das larvas escolhemos analisar os pulmões, fígado e encéfalo dos animais infectados.

A avaliação histopatológica realizada por Resende (*et al*, 2015), no tecido pulmonar no 7º e 14º dia após-infecção, apresentou lesões de parênquima caracterizadas por espessamento de septo, presença de infiltrado inflamatório intenso e áreas hemorrágicas, achados esses equiparados aos de Leal-Silva (2021).

Já nossas análises histopatológicas do tecido pulmonar, apresentaram em ambos os grupos e tempos a inflamação peribrônquica e de parênquima, mas no grupo G100 houve predominância na inflamação de parênquima, ocorrendo espessamento de septos interalveolares devido a presença de infiltrado inflamatório, edema perivascular e infiltrado peribronquiolar. Estando nossos achados do grupo G100 corroboráveis com os de Pinelli (*et al*, 2007), que encontrou infiltração perivascular e peribrônquica, que persistiram até o 60º dia após-infecção.

Na avaliação da inflamação total dos pulmões, encontramos no grupo G1000 um aumento da inflamação em relação ao grupo G100, com espessamento de septos interalveolares e infiltrado peribronquiolar, tais achados também correspondem aos de Pinelli (*et al*, 2007) em inóculos de 1.000 ovos larvados.

O grupo de maior inoculo apresentou intensa patologia em comparação ao grupo de menor inoculo, ocorrendo inflamação peribrônquica, perivascular e de parênquima, sendo o score equiparado entre os grupos, enquanto Leal-Silva (2021) encontrou menor lesão de parênquima na fase subaguda da infecção.

Quanto ao escore de granuloma, encontramos esse apenas no grupo G1000, havendo maior score na fase crônica em comparação a subaguda, nossos achados se equiparam aos de Leal-Silva (2021). E, não foram observadas hemorragias, visto que o método de decapitação acabou acarretando em aspirado pulmonar e com isso não foi possível realizar essa análise, resultado distinto do de Leal-Silva (2021) que encontrou hemorragia tecidual em todas as fases da infecção.

A histopatologia hepática apresentou lesão apenas no grupo G1000 em ambas as fases de infecção analisadas, fase subaguda da infecção 14DPI e fase crônica da infecção 42DPI, enquanto que granulomas hepáticos foram encontrados apenas na fase subaguda da infecção 14DPI, os animais ainda apresentaram infiltrado inflamatório no parênquima hepático e zonas de necrose, tais achados ocorreram também no grupo G100. Nossos

achados corroboram com os de Leal-Silva (2021) que apresentou no inoculo de 1.000 ovos larvados, presença de granuloma, zonas de necrose e larvas no tecido hepático e diminuição no score de granuloma hepático da fase subaguda para a fase crônica da infecção.

Nossa análise histológica encefálica não apresentou resultados conclusivos, sendo esses divergentes com os achados de Janecek, (*et al*, 2014), que ao estudar animais C57BL/6 infectados com 2.000 ovos larvados, realizou cortes coronários do encéfalo na coordenada do bregma zero, e para obtenção dos cortes de 2 μ m de espessura preparou as lâminas em parafina coradas em HE. Os achados predominaram no cérebro dos animais encontrando-se, alterações na estrutura encefálica, com presença de micróglia ativa, acúmulo focal de células gitter, danos de axônios e hemorragia no córtex cerebral até o 14º dia de infecção, pois ocorreu reabsorção e encontradas esporadicamente no percurso da infecção.

Com os achados de Springer (*et al*, 2019) que ao empregar o mesmo método que Janecek (*et al*, 2014), encontrou alterações degenerativas de substância branca cerebelar e alterações cerebral no trato de fibras do corpo caloso, região do fórnix, trato corticoespinhal e comissura anterior. Além disso, presença de células gitter e desmielinização de axônios foram melhor observadas na fase crônica da infecção.

E os achados de Leal-Silva (2021) que encontrou um score de hemorragia, havendo da fase aguda para subaguda diminuição e da subaguda para a crônica aumento e aspecto compatível com a normalidade.

7. Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que, inóculos com número menor de ovos larvados podem acarretar em não recuperação larval em tecidos somáticos, e que análises do tecido muscular podem auxiliar no melhor entendimento quanto a migração larval.

Quanto ao peso dos animais encontramos taxas de ganho de peso normais, demonstrando que a infecção por *Toxocaraca canis* não apresentou mortalidade, e há uma morbidade menos acentuada que outras infecções helmínticas que chegam ao sistema nervoso central, como a angiostrongilíase causada pelo *Angiostrongylus cantonensis*.

Nossos achados com os testes psicobiológicos demonstraram haver um quadro do comportamento tipo ansiolítico nos animais com menor inoculo, e nos animais com maior inoculo comportamento tipo ansiogênico, demonstrando assim a ocorrência de efeitos distintos no sistema nervoso central, sendo esses dependentes do número de ovos larvados inoculados.

Ao olharmos para o comportamento tipo depressivo, percebemos que os animais com maior inoculo, grupo G1000, apresenta um quadro tipo depressivo quando comparados aos de menor inoculo, grupo G100. Mas, as comparações do grupo G1000 com o grupo controle, apresentam significância quanto ao comportamento tipo depressivo apenas na fase crônica da infecção, no caso do nosso estudo, no 42º dia após infecção.

Com isso, percebemos há necessidade de mais análises comportamentais, e análises em torno do início da fase crônica da infecção, no 28º dia após infecção, com inóculos distintos para compreendermos melhor os comportamentos tipo ansioso e tipo depressivo dos animais. Mas, nosso estudo apresentou haver diferenças entre os inóculos.

Além disso, utilizamos as citocinas IL-6 e TNF- α , além da quimiocina CCL-17 pró-inflamatórias, como marcadores secundários da infecção, trazendo assim outros parâmetros de confirmação para a infecção pelo parasito *T. canis*, e encontrando níveis séricos parecidos quando comparados os grupos de menor e maior carga parasitária.

Outro parâmetro utilizado foi o histopatológico, em que as lâminas do tecido pulmonar auxiliaram na confirmação da infecção do grupo G100, que mesmo sem recuperação larval apresentou danos no tecido pulmonar, demonstrando haver possivelmente migração larval pelo tecido, enquanto que, os achados no grupo G1000 são corroboráveis com a literatura.

Já os achados no tecido hepático, afirmaram a migração larval em ambos os grupos pela região e a presença de dano tecidual maior no grupo G1000. Enquanto, a

análise histopatológica do tecido encefálico utilizando processamento tecidual em Criomicrotomia com coloração de Nissl, com fatias de 100 μ m, se apresentou incompatível com o estudo, sendo necessária nova análise pelo método com outras espessuras de cortes.

Em nossos achados, concluímos que animais inoculados com menor carga parasitária podem não apresentar recuperação larval, mas em conjunto com outras análises, é possível constatar o processo infeccioso no animal. Além disso, inóculos menores levam os animais a apresentarem um comportamento tipo ansiolítico, no qual os animais se arriscam mais no ambiente, possibilitando a predação do mesmo, danos em tecido pulmonar e hepático, que confirmam a migração das larvas, e níveis sérios de citocinas e quimiocina pró-inflamatória. Sendo esse um processo básico de constatação e entendimento sobre o processo infeccioso e relação parasito-hospedeiro.

Já o grupo G1000 apresentou recuperação larval maior na fase crônica em comparação a fase aguda, com um comportamento tipo ansiogênico que levou os animais a se arriscarem menos no ambiente, havendo danos em tecido pulmonar e hepático, que se apresentaram maiores na fase crônica e níveis séricos de citocinas e quimiocina pró-inflamatórias na fase crônica. Com isso, diferente de inóculos menores, os inóculos maiores conseguem demonstrar a cronicidade da infecção por *T. canis* no hospedeiro paratênico murino.

Com isso, nossos achados são de extrema importância para o entendimento da interação parasito e hospedeiro na infecção por *T. canis*, pois ele apresenta elementos multidisciplinares e interdisciplinares que trazem à tona uma nova forma de entendermos o processo infeccioso, além disso, ele trouxe elementos que acarretaram em mais questionamentos sobre a toxocarose murina e a diferença entre inóculos menores e maiores.

Referências

- Abo-Shehada, M. N.; Herbert, I. V. The migration of larval *Toxocara canis* in mice II. Post-intestinal migration in primary infections. **Veterinary Parasitology**. v.17, n.1, p. 75-83. Dez. 1984. Doi:10.1016/0304-4017(84)90066-9. Acesso em 03 ago. 2021.
- Abo-Shehada, M. N.; Al-Zubaidy, B. A.; Hebert, I. V. The migration of larval *Toxocara canis* in mice I. Migration through the intestine in primary infections. **Veterinary Parasitology**. v. 17, n. 1, p. 65-73. Dez. 1984. Doi:10.1016/0304-4017(84)90065-7. Acesso em 30 jul. 2021.
- Abou-El-Naga, I. F. Desarrollo y viabilidad de huevos de *Toxocara canis*. **Biomédica Revista del Instituto Nacional de Salud**. v. 38, n 2, p.189-197. Jun. 2018. Doi: 10.7705/biomedica.v38i0.3684. Disponível em <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3684>. Acesso em 29 jul. 2021.
- Adamo, S.A. Parasites:evolution's neurobiologists. **The Journal of Experimental Biology**. v.216, n. 1, p. 3-10. Jan. 2013. Doi: 10.1242/jeb.073601. Acesso em 19 maio 2021.
- Akao, N. Critical Assessment of existing and novel model systems of toxocaríasis. In: Holland, C.V.; Smith, H. V. (org.). **Toxocara, the enigmatic parasite**. Cambridge: CABI Publishing, 2006, cap.6, p. 74-85.
- Akao, N.; Ohta, N. Toxocaríasis in Japan. **Parasitology International**. v. 56, n. 2, p. 87-93. Jan. 2007. Doi: 10.1016/j.parint.2007.01.009. Acesso em 17 maio 2021.
- Allen, J. E.; Maizels, R. M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews Immunology**. p. 375-388. Maio 2011. Doi:10.1038/nri2992. Acesso em 30 abril 2021.
- Alvarado-Esquivel, C., *et al.* Low seroprevalence of *Toxocara* infection in schizophrenic inpatients in Durango, Mexico: a case control study. **International Journal of Biomedical Science**. v. 10, n. 4, p. 269-271. Dez. 2014.
- Araujo, P. Observações pertinentes à primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. p.83-90. 1972.
- Auer, H.; Walochnik, J. Toxocaríasis and the clinical spectrum. **Avances in Parasitology**. v. 109, p. 111-130. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.005. Acesso em 29 jul 2021.
- Axelerad, A., *et al.* Clinical spectrum of symptoms in cerebral Toxocaríasis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**. v.21, n.5. Mar. 2021. Doi: 10.3892/etm.2021.9953. Acesso em 20 jul. 2021.

Bisseru, B. Studies on the liver, lung, brain and blood of experimental animals infected with *Toxocara canis*. **Journal of Helminthology**. v.43, n. 3-4, p. 267-272. Set. 1969. Doi: 10.1017/s0022149x00004806. Acesso em 03 ago. 2021.

Blasco-Serra, A. *et al.* A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. **Neuroscience Letters**. p.73-78. Set. 2017. Doi:10.1016/j.neulet.2017.08.019. Acesso em 15 março 2021.

Bowman, D. D. History of *Toxocara* and the associated larva migrans. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 17-38. Abr. 2020a. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.037. Acesso em 29 jul 2021.

Bowman, D. D. The anatomy of the third-stage larva of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 39-61. Abr. 2020b. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.03.002. Acesso em 29 jul. 2021.

Breedlove, S.M; Watson, N.V. **Behavioral Neuroscience**. 8 ed. Shauer Asscoates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts. 2017.

Bruňaská, M.; Dubinský, P.; Reiterová, K. *Toxocara canis* ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. **International Journal for Parasitology**.v.25, n.6, p. 683-690. Jun. 1995. Doi: [10.1016/0020-7519\(94\)00183-O](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00183-O). Disponível em [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(94\)00183-O](https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00183-O). Acesso em 15 maio 2021.

Brusca, R. C.; Moore, W.; Shuster, S. M. (org.). **Invertebrados**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2018. 1032p.

Camparoto M.L., *et al.*. Initial stage of development and migratory behavior of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mouse experimental model. **Genet. Mol. Res.** v.7, n 2, p. 444-450. Maio 2008. Doi:10.4238/vol7-2gmr443. Acesso em 20 maio 2021.

Castanõ Barrios, L., *et al.* Behavioral alterations in longterm *Toxoplasma gondii* infection of C57BL/6 mice are associated with neuroinflammation and dsruption of the blood brain barrier. **Plos One**. Out. 2021. n. 10, v. 16. Doi: 10.1371/journal.pone.0258199. Acesso em dezenbro de 2021.

Castro, V. N. *et al.* Systemic cytokine and chemokine profiles in individuals with *Schistosoma mansoni* infection and low parasite burden. **Front. Immunol.** 2018. Doi: 10.3389/fimmu.2018.02975. Acesso em 23 fev. 2022.

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*. **Parasites – Toxocariasis (also known as Roundworm Infection)**. USA, CDC, 2020. Disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/>. Acesso em 10 maio 2021.

Chen, J. *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. **Infectious Diseases of Poverty**. v. 7, n.59. Jun. 2018. Doi: 10.1186/s40249-018-0437-0. Acesso em 22 Jul. 2021.

Chieffi, P. P. *et al.* Human toxocariasis: 2010 to 2020 contributions from Brazilian researchers. **Research and Reports in Tropical Medicine**. Maio 2021. Doi: 10.2147/RRTM.S274733. Acesso em 26 maio 2021.

- Cortés, A. *et al.* Th2 and Th1 responses: clear and hidden sides of immunity against intestinal helminths. **Trends in Parasitology**. v. 33, n.9, p. 678-693. Maio. 2017. Doi: 10.1016/j.pt.2017.05.004. Acesso em 05 ago. 2021.
- Cox, D. M, Holland, C. (1998). The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis* infected mice and social behaviour and anxiety in the host. **Parasitology**. Jun 1998. Doi: 10.1017/s0031182098002649. Acesso em 17 maio 2021.
- Cox, D. M.; Holland, C. V. Influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. **Journal of Helminthology**. v.75, n. 1, 23-32. Fev. 2001a. Doi:10.1079/JOH200027. Acesso em 17 maio 2021.
- Cox, D. M.; Holland, C. V. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. **Journal of Helminthology**. v. 75, n. 1, p. 33-41. Jan. 2001b. Doi:10.1079/JOH200028. Acesso em 17 maio 2021.
- Dantas-Torres, F. *Toxocara* prevalence in dogs and cats in Brazil. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 715-741. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.028. Acesso em 29 jul 2021.
- Deshayes, S.; Bonhomme, J.; La Blanchardière, A. Neurotoxocariasis: a systematic literature review. **Infection**. n.44, p. 565-574. Out. 2016. Doi: 0.1007/s15010-016-0889-8. Acesso em 24 jul. 2021.
- Despommier, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, n. 2, p. 265-272. Abr. 2003. Doi: 10.1128/CMR.16.2.265-272.2003. Acesso em 27 jul. 2021.
- Dewsbury, D.A. Psychobiology. **American Psychologist**. 46(3), p. 198-205. 1991. Doi: 10.1037/0003-066X.46.3.198. Acesso em 25 de fev. 2022.
- Epe, C. Intestinal Nematodes: Biology and Control. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 39, n 6, p.1091-1107. Nov. 2009. Doi: 10.1016/j.cvsm.2009.07.002. Disponível em [10.1016/j.cvsm.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.07.002). Acesso em 24 jul. 2021.
- Epe, C. *et al.* The behavior and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains. **Parasitol Res**, v. 80, p. 691-695. Jun 1994. Doi: 10.1007/bf00932955
- Fan, C. K. Pathogenesis of cerebral toxocariasis and neurodegenerative diseases. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 233-259. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.008. Acesso em 29 jul 2021.
- Ferreira, J. *et al.* Occurrences of gastrointestinal parasites in fecal samples from domestic dogs in São Paulo, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.25, n. 4. Dez. 2016. Doi: 10.1590/s1984-29612016081. Acesso em 17 maio 2021.

- Fialho, P. M. M.; Correa, C. R. S.; Lescano, S. Z. Seroprevalence in Brazil. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 357-374. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.013. Acesso em 29 jul 2021.
- Gale, S. D.; Hedges, D. W. Neurocognitive and neuropsychiatric effects of toxocariasis. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 17-38. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.009. Acesso em 29 jul 2021.
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H.; Nutman, T. B. Helminth parasites and immune regulation. **Faculty Rev. Out.** 2018. Doi: 10.12688/f1000research.15596.1. Acesso em 25 fev. 2022.
- Geiger, S. M. *et al.* Serum CCL11 (eotaxin-1) and CCL17 (TARC) are serological indicators of multiple helminth infections and are driven by *Schistosoma mansoni* infection in humans. **Trop. Med. Int. Health**. Mar. 2013. Doi: 10.1111/tmi.12095. Acesso 20 jan 2022.
- Godfrey, S.S.; Poulin, R. Host manipulation by parasites. **In Animal Behavior Parasitism**. Ezenwa, V.O.; Altizer, S.; Hall, R. J. Oxford University Press. 2022. Doi: 1093/osd/9780192895561.003.0012. Acesso em 25 fev. de 2022.
- Hamilton, C. M. *et al.* A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. **Parasitology**. v. 132, n.6, p. 791-801. Jun. 2006. Doi: 10.1017/S0031182006009887. Acesso em 18 maio 2021.
- Hoeppli, R.; Feng, L. C.; Li, F. Histological reactions in the liver of mice due to larvae of different *Ascaris* species. **Peking Natural History Bulletin**. v.18, n. 2, p. 119-131. 1949.
- Holland, C. V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. **Cambridge University Press - Parasitology**. Dez. 2015. Doi:10.1017/S0031182015001407. Acesso em 27 jul. 2020.
- Holland, C. V.; Cox, D. M. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? **Journal of Helminthology**. Jun. 2001 Doi:10.1079/JOH200169. Acesso em 17 maio 2021.
- Horowitz, A. Considering the "dog" in dog-human interaction. **Frontiers in Veterinary Science**. Maio 2021. Doi: 10.3389/fvets.2021.642821. Acesso em 15 maio 2021.
- Hotez, P. J. Toxocariasis: a neglected infection for the antropocene epoch. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 879-883. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.03.004. Acesso em 29 jul. 2021.
- Hotez, P. J.; Wilkins, P. P. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? **Plos Neglected Tropical Diseases**. Mar. 2009. Doi:10.1371/journal.pntd.0000400. Acesso em 5 maio 2021.

- Jakubzick, C. *et al.* Role of CCR5 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. **Am. J. Pathol.** p. 1211-1221. Jun 2004. Doi:10.1016/S0002-9440(10)63381-0. Acesso 5 fev. 2022.
- Jalongo, M. R. Keeping in the time of COVID-19: the canine and feline companions of young children. **Early Childhood Educ J.** Ago. 2021. Doi: 10.1007/s10643-021-01251-9. Acesso em 15 set. 2021.
- Janecek, E. *et al.* Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. **Parasites Vectors.** Maio 2014. Doi:10.1186/1756-3305-7-194. Acesso em 20 ago. 2021.
- Janecek, E. *et al.* Abnormal neurobehaviour and impaired memory function as a consequence of *Toxocara canis* - as well as *Toxocara cati*- induced neurotoxocarosis. **Plos Neglected Tropical Diseases.** Maio 2017. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005594. Acesso em 23 abr. 2021.
- Jhan, K. L. *Angiostrongylus cantonensis* causes cognitive impairments in heavily infected BALB/c and C57BL/6 mice. **Parasites & Vectors.** Ago. 2020. Doi:10.1186/s13071-020-04230-y. Acesso em 28 ago. 2021.
- Jourdan, P. *et al.* Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet.** Set. 2017. Doi:10.1016/S0140-6736(17)31930-X. Acesso em: 19 abr. 2021.
- Kayes, S. G.; Jones, R. E.; Omholt, P. E. Use of bronchoalveolar lavage to compare local pulmonary immunity with the systemic immune response of *Toxocara canis*-infected mice. **Infection and Immunity.** v. 55, n. 9, p. 2132-2136. Set. 1987. Doi:10.1128/iai.55.9.2132-2136.1987. Acesso 19 abr. 2021.
- Kolbeková, P. *et al.* Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. **Parasitology Research.** Abr. 2011. Doi: 10.1007/s00436-010-2145-y. Acesso em 30 abr. 2021.
- Kolbeková, P. *et al.* *Toxocara canis* larvae reinfection BALB/c mice exhibit accelerated speed of migration to the host CNS. **Parasitology Research.** Nov. 2011b. Doi: 10.1007/s00436-011-2371-y. Acesso em 30 abr. 2021.
- Leal-Silva, T. (2021). *Caracterização da resposta imunológica na infecção experimental por Toxocara canis.* Belo Horizonte: Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- Leal-Silva, T. *et al.* Detrimental role of IL-33/ST2 pathway sustaining a chronic eosinophil-dependent Th2 inflammatory response, tissue damage and parasite burden during *Toxocara canis* infection in mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** v. 15, n.7. Jul 2021. Doi: 10.1371/journal.pntd.0009639. Acesso em 4 ago. 2021.
- Ma, G. *et al.* Human toxocariasis. **The Lancet Infectious Diseases.** Ago. 2017. Doi: 10.1016/S1473-3099(17)30331-6. Acesso em 23 abr. 2021.

Macpherson, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**. Nov. 2013. Doi: 10.1016/j.ijpara.2013.07.004. Acesso em 30 abr. 2021.

Meliou, M. *et al.* Toxocariasis of the nervous system. **Acta Parasitologica**. Jun. 2020. Doi: 10.2478/s11686-019-00166-1. Acesso em 28 abr. 2021.

Melo, A. L. Tópicos em Parasitologia - Procedimentos rotineiros utilizados para manutenção, colheita, fixação, coloração montagem, identificação de helmintos e alguns vetores de doenças parasitárias. **Apostila de sala de aula**. 2009. Departamento de Parasitologia - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Miranda, G. S. *et al.* Previous history of american tegumentary leishmaniasis alters susceptibility and immune response against *Schistosoma mansoni* infection in humans. **Frontiers in Immunology**. Mar. 2021. Doi: 10.3389/fimmu.2021.630934. Acesso em 20 fev. 2022.

Mwangi, W.; Figueiredo, P.; Criscitiello, M. F. One health: addressing global challenges at the nexus of human, animal, and environmental health. **Plos Pathogens**. Set. 2016. Doi:10.1371 / journal.ppat.1005731. Acesso em 23 abr. 2021.

Neves, D. *et al.* (org.). **Parasitologia Humana** 13^a ed. São Paulo: Atheneu, 2018. 264 p.

Nichols, R. L. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. **Journal of Parasitology**. v.42, n.4, p.349-362. Ago. 1956.

Oliveira, F. M. S. *et al.* Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. **PLoS neglected tropical diseases**. Nov. 2019. Doi: [10.1371/journal.pntd.0007896](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007896). Acesso em 26 maio 2021.

Overgaaauw, P. A. M.; Van Knapen, F. Veterinary and public aspects of *Toxocara* spp. **Veterinary Parasitology**. v. 193, n 4, p.398-403. Abr. 2013. Doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.035. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>. Acesso em 29 jul. 2021.

Overgaaauw, P. A. M. *et al.* A one health perspective on the human-companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Maio 2020. Doi:10.3390/ijerph17113789. Acesso em 23 abr. 2021.

Papavasiliopoulos, V. *et al.* Soil contamination by *Toxocara canis* and human seroprevalence in the Attica region, Greece. **Germs**. Set. 2018. Doi: 10.18683 / germs.20181143. Acesso em 19 abril 2021.

Papousek, I. *et al.* The impacts of the presence of an unfamiliar dog on emerging adults' physiological and behavioral responses following social exclusion. **Behavioral Sciences**. Dez. 2020. Doi: 10.3390/bs10120191. Acesso em 25 abril 2021.

Pinel J.P.J; Barnes, S.J. **Biopsychology**. 20 ed. Pearson. Chicago, 2018.

Pinelli, E., *et al.* *Toxocara canis*: effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**. v.1, n.115, p.76-82. Jan. 2017. Doi:10.1016/j.exppara.2016.06.002. Acesso em 15 out. 2021.

Porsolt, R. D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch. Int. Pharmacodyn Ther.** Out. 1977. v.2, n.229, p. 327-336.

Powell, L. *et al.* Companion dog acquisition and mental well-being: a community-based three-arm controlled study. **BMC Public Health**. Nov. 2019. Doi: 10.1186/s12889-019-7770-5. Acesso em 30 abr. 2021.

Powell, T. R., Fernandes, C., Schalkwyk, L. Depression-related behavioral tests. **Current Protocols in Mouse Biology**. Jun. 2012. v.2, n.2, p.119-127. Doi: 10.1002/9780470942390.mo110176. Acesso em 14 mar. 2021.

Radwan, N. A.; Khalil, A. I.; El Mahi, R. A. Morphology and occurrence of species of *Toxocara* in wild mammal populations from Egypt. **Comparative Parasitology**. Jul. 2009. Doi: 10.1654/4367.1. Acesso em 7 mar. 2021.

Resende, N. *et al.* New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. **Parasites & Vectors**. Jul. 2015. Doi:10.1186/s13071-015-0962-7. Acesso em 7 mar. 2021.

Rocha, M.; Costa, A. Exame Parasitológico de Fezes. *In*: Neves, D. *et al.* (org.). **Parasitologia Humana** 13ª ed. São Paulo: Atheneu, 2018. 264 p.

Rostami, A. *et al.* Global prevalence of *Toxocara* infection in dogs. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 585-614. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.010. Acesso em 29 jul. 2021.

Rostami, A. *et al.* Human toxocariasis - A look at a neglected disease through an epidemiological "prism". **Infection, Genetics and Evolution**. v.74. Out. 2019. Doi: 10.1016/j.meegid.2019.104002. Acesso em 10 abr. 2021.

Ruiz-Manzano, R. A. *et al.* Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. **Parasite Immunology**. v. 41, n.12. Set. 2019. Doi: 10.1111/pim.12672. Acesso em 06 ago. 2021.

Saldanha-Elias, A. M., Silva, M. A., Silva, V. O., *et al.* Prevalence of endoparasites in urban stray dogs from Brazil diagnosed with Leishmania, with potential for human zoonoses. **Acta Parasitologica**. v. 64, p. 352-359. Abr. 2019. Doi:10.2478/s11686-019-00043-x. Acesso em 17 maio 2021.

Samuels, B. A., Hen, R. Novelty-suppressed feeding in the mouse. *Em* Gould T. **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice**. **Neuromethods**. v.63. Ago. 2011. Doi:10.1007/978-1-61779-313-4_7. Acesso em 27 julho 2021.

- Schacher, J. F. A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. **The Journal of Parasitology**. v. 43, n.6, p. 599-612. Dez. 1957. Doi: [10.2307/3286548](https://doi.org/10.2307/3286548). Disponível em <https://www.jstor.org/stable/3286548>. Acesso em 17 jul. 2021.
- Schneider, D. S.; Ayres, J. S. Two ways to survive infection: what resistance and tolerance can teach us about treating infectious diseases. **Nature Rev. Immunol.** v. 8, p.889-895. Nov. 2008. Doi: [10.1038/nri2432](https://doi.org/10.1038/nri2432)
- Schnieder, T.; Laabs, E. M.; Welz, C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 175, n 3-4, p. 193-206. Feb. 2011. Doi: [10.1016/j.vetpar.2010.10.027](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027). Disponível em [https://Doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027). Acesso em 27 jul. 2020.
- Schoch, C. *et al.* NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. **The Journal of Biological Databases and Curation (Oxford)**. Ago. 2020. Doi: [10.1093/database/baaa062](https://doi.org/10.1093/database/baaa062). Acesso em 15 ago. 2021.
- Springer, A. *et al.* Histopathological characterization of *Toxocara canis* and *T. cati*-induced neurotoxocarosis in the mouse model. **Parasitology Research**. Set. 2019. Doi: [10.1007/s00436-019-06395-7](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06395-7). Acesso em set. 2020.
- Strube, C.; Heuer, L.; Janecek, E. *Toxocara spp.* infections in partenitic hosts. **Veterinary Parasitology**.v. 193, n. 4, p. 375-389, Abr. 2015. Doi: [10.1016/j.vetpar.2012.12.033](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033). Disponível em [https://Doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033). Acesso em 27 jul. 2020.
- Strube, C. *et al.* *Toxocara* induced neural larva migrans (neurotoxocarosis) in rodent model hosts. **Advances in Parasitology**. v. 109, p. 189-218. Abr. 2020. Doi: [10.1016/bs.apar.2020.01.006](https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.006). Acesso em 29 jul. 2021.
- Taylor, M. A.; Coop, R. L.; Wall, R. L. (org.) **Parasitologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1052 p.
- Vilar-Pereira, G. S. (2012). *Trypanosoma cruzi* induced depressive-like behavior is independent of meningoencephalitis but responsive to parasiticide and TNF-targeted therapeutic interventions. *Brain, behavior and Immunity*, 1136-1149. Doi:[10.1016/j.bbi.2012.07.009](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.009)
- Waindok, P. Strube, C. Neuroinvasion of *Toxocara canis* and *T. cati* larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile. **Journal of Neuroinflammation**. v. 16, 147. Jul. 2019. Doi: [10.1186/s12974-019-1537-x](https://doi.org/10.1186/s12974-019-1537-x). Acesso em 20 dez 2021.
- Weatherhead, J. E. *et al.* Host immunity and inflammation to pulmonary helminth infections. **Front. Immunol.** Out 2020. Doi: [10.3389/fimmu.2020.594520](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594520). Acesso em jan. 2022.
- Webster, G. A. A report on *Toxocara canis* , 1782. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**. v. 22, n. 8, p. 272-279. Ago. 1958.

Wilder, H. C. Nematode endophthalmitis. **Transactions of the American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology**. n. 55, p.99-109. Nov.-Dez.1950.

Wu, T.; Bowman, D. D. Visceral larval migrans of *Toxocara cani* and *Toxocara cati* in non-canid and non-felid hosts. **Advances in Parasitology**. Abr. 2020. Doi: 10.1016/bs.apar.2020.02.001. Acesso em 29 jul.2021.

Zawawi, A.; Else, K. Soil-transmitted helminth vaccines: are we getting closer? **Frontiers in Immunology**. Set. 2020. Doi:10.3389/fimmu.2020.576748. Acesso em: 19 abr. 2021.

Zyoud, S. H. Global toxocariasis research trends from 1932 to 2015: a bibliometric analysis. **Health Research Policy Systems**. Fev. 2017. Doi: 10.1186/s12961-017-0178-8. Acesso em 27 abr. 2021.