

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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA INFECÇÃO**  
**EXPERIMENTAL POR *Toxocara canis***

**Nathália Maria Resende**

**Belo Horizonte - MG**

**2015**

**Nathália Maria Resende**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *Toxocara canis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

Área de Concentração: Helminologia

Orientador: **Dr. Ricardo Toshio Fujiwara**

Coorientador: **Dr. Gustavo Tadeu Volpato**

**Belo Horizonte - MG**

**2015**



043

Resende, Nathália Maria.

Efeitos do exercício físico na infecção experimental por *Toxocara canis*  
[manuscrito] / Nathália Maria Resende. – 2015.

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

Orientador: Ricardo Toshio Fujiwara. Co-orientador: Gustavo Tadeu Volpato.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas.

1. Exercícios físicos – Teses. 2. Toxocara – Teses. 3. Natação – Teses. 4. IL-6 –  
Teses. 5. Neutrófilos – Teses. 6. Parasitologia – Teses. I. Fujiwara, Ricardo  
Toshio. II. Volpato, Gustavo Tadeu. III. Universidade Federal de Minas Gerais.  
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxocologia Reprodutiva (FISIOTOX) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e coorientação do Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato.

## **COLABORADORES**

---

### **Departamento de Parasitologia - ICB/UFMG**

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Dra. Lílian Lacerda Bueno

Dr. Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães

Dr. Rodrigo de Almeida e Lourdes

Msc. Fernando Sérgio Barbosa

Msc. Lucas de Carvalho Dhom Lemos

Msc. Denise Silva Nogueira

Msc. Luciana Maria de Oliveira

Msc. Caroline Cavalcanti Silva

Msc. Marco Túlio Porto Gonçalves

Ana Clara Gazzinelli-Guimarães

Chiara Cássia Oliveira Amorim

Flaviane Nunes da Silva

Acácia Rebello Coutinho

### **Departamento de Patologia – ICB/UFMG**

Profª. Dra. Milene Alvarenga Rachid

Prof . Dr. Marcelo Vidigal Caliri

Msc. Fabrício Marcus Silva Oliveira

### **Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/UFMT**

Msc. Rafaianne Queiroz de Moraes Souza

Msc. Thaigra de Sousa Soares

**ÓRGÃOS FINANCIADORES:** CAPES/FAPEMIG/CNPq

***Dedico este trabalho ao GRUPO ASCARIS.***

***À vocês, com toda minha gratidão!***

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus por sempre me proteger!

Ao meu orientador Ricardo pela paciência e esforços dedicados a minha formação e por ser um exemplo de seriedade, ética e profissionalismo, liderando o grupo com muita maestria. À Lílian, sua fiel companheira também na ciência, por ser tão atenciosa e prestativa. A dedicação de vocês é contagiante!

Ao meu coorientador Gustavo por acreditar sempre no meu potencial e à Rosa pela amizade. Quero tê-los sempre perto de mim!

Ao GRUPO ASCARIS, Stefan, Pedro, Fernando, Luciana Maria, Denise, Lucas, Ana Clara e Chiara, pela parceria, apoio e motivação ao longo desse período. Que sejamos para sempre esse grupo de amizade! Tenho muito orgulho e privilégio de estar entre vocês!

Ao LIGP, especialmente à professora Daniella, pelo investimento. À Michele, Mariana, João, Ana Luiza, Gabi, Soraya e Nadine, pois vocês fazem a diferença no mundo e eu definitivamente sou muito mais feliz por tê-los em minha vida!

Ao FISIOTOX, especialmente à Rafaianne e Thaigra, por serem doce e exemplo de disposição! Vocês duas merecem toda minha dedicação no que for preciso!

À minha família, por me amar destemidamente e por aceitar a minha ausência sem cobranças. Vocês são minha essência!

Ao meu lindo namorado Rafael por ser estratosféricamente companheiro e amável! A vida tem super sentido ao seu lado! À sua família que me acolheu com tanto carinho e se tornou minha família.

Aos Woosh pelo divertimento, especialmente à Bruna por fazer jus à amizade. Brunilda, gosto muito de você!

À todos meus amigos, por serem MEUS!

Aos colaboradores desta tese pela ajuda.

À UFMT-CUA pelo investimento na minha capacitação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do ICB-UFMG, especialmente à Sumara, Sibele, Ellemárcia e Batatinha por estarem sempre presentes prontos a ajudar!

Às agências financiadoras, CAPES/FAPEMIG/CNPq, por tornarem este trabalho viável.

## SUMÁRIO

---

|  |             |
|--|-------------|
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>   | <b>v</b>    |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>  | <b>vii</b>  |
| <b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>  | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>  | <b>xi</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>  | <b>xii</b>  |
| <b>RESUMO .....</b>  | <b>xiii</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>xiv</b>  |
| <br>   |             |
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>I.1. TOXOCAROSE HUMANA .....</b>  | <b>2</b>    |
| I.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial .....  | 3           |
| I.1.2. Ciclo Biológico e Transmissão.....  | 5           |
| I.1.3. Morfologia do <i>Toxocara canis</i> .....                                       | 7           |
| I.1.4. Patogênese e Manifestações Clínicas .....                                       | 9           |
| I.1.5. Diagnóstico.....  | 11          |
| I.1.6. Tratamento.....   | 12          |
| I.1.7. Profilaxia .....  | 13          |
| <b>I.2. RESPOSTA IMUNE NA TOXOCAROSE HUMANA .....</b>                                  | <b>14</b>   |
| <b>I.3. IMUNOLOGIA DO EXERCÍCIO FÍSICO.....</b>  | <b>17</b>   |
| I.3.1. Exercício Físico nas Helminthoses.....  | 21          |
| <b>II. JUSTIFICATIVA .....</b>   | <b>23</b>   |
| <b>III. OBJETIVOS .....</b>  | <b>25</b>   |
| <b>III.1. Objetivo Geral.....</b>  | <b>26</b>   |
| <b>III.2. Objetivos Específicos.....</b>   | <b>26</b>   |
| <b>IV. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>28</b>   |
| <b>IV.1. Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....</b> | <b>29</b>   |
| <b>IV.2. Animais .....</b>   | <b>29</b>   |
| <b>IV.3. Infecção Experimental por <i>Toxocara canis</i> .....</b>                     | <b>29</b>   |
| IV.3.1. Parasito .....   | 29          |
| IV.3.2. Inoculação dos ovos .....  | 30          |
| <b>IV.4. Grupos Experimentais.....</b>   | <b>30</b>   |
| <b>IV.5. Protocolo de Treinamento Físico.....</b>                                      | <b>34</b>   |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>IV.6. Análise do Sangue Periférico .....</b>   | <b>35</b> |
| IV.6.1. Perfil Hematológico .....   | 35        |
| IV.6.2. Perfil de Citocinas Sistêmicas .....  | 35        |
| <b>IV.7. Quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> .....</b>  | <b>36</b> |
| <b>IV.8. Análise dos Tecidos .....</b>  | <b>37</b> |
| IV.8.1. Perfil de Citocinas nos Tecidos .....   | 37        |
| IV.8.2. Atividade Enzimática nos Tecidos .....  | 37        |
| IV.8.3. Histopatologia .....  | 39        |
| <b>IV.9. Análise Estatística .....</b>  | <b>39</b> |
| <b>V. RESULTADOS.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>PARTE 1 - Determinação do protocolo de infecção por <i>Toxocara canis</i> em camundongos BALB/c adultos. ....</b>  | <b>41</b> |
| <b>V.1. Análise dos ovos nas culturas do parasito <i>Toxocara canis</i>.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>V.2. Análise parasitológica da recuperação das larvas de <i>Toxocara canis</i> nos tecidos de camundongos BALB/c.....</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>V.3. Análise histopatologia em camundongos BALB/c infectado por <i>Toxocara canis</i>...</b>   | <b>44</b> |
| V.3.1. Análise da área de infiltrado inflamatório no tecido hepático em camundongos infectado por <i>Toxocara canis</i> .....                                     | 44        |
| V.3.2. Análise do espessamento do septo no tecido pulmonar em camundongos infectado por <i>Toxocara canis</i> .....   | 46        |
| V.3.3. Análise da área de hemorragia no tecido cerebral em camundongos infectado por <i>Toxocara canis</i> .....  | 48        |
| <b>V.4. Análise do sangue periférico de camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> .....</b>  | <b>50</b> |
| V.4.1. Caracterização do perfil leucocitário, eritrocitário e plaquetário de camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> .....                               | 50        |
| <b>V.5. Análise da resposta inflamatória de camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i></b>  | <b>51</b> |
| V.5.1. Caracterização do perfil de citocinas plasmáticas de camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> .....  | 51        |
| <b>PARTE 2.. - Verificação do efeito do exercício físico moderado na infecção experimental por <i>Toxocara canis</i> em camundongos BALB/c adultos. ....</b>      | <b>53</b> |
| <b>V.6. Análise do protocolo de exercício físico em camundongos BALB/c infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> .....</b>                                      | <b>54</b> |
| V.6.1. Análise do desenvolvimento corporal dos camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico ..... | 54        |

|   |           |
|---|-----------|
| V.6.2. Análise do desempenho físico e intensidade de esforço dos camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ao protocolo de exercício físico.....   | 56        |
| <b>V.7. Análise parasitológica da quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> em camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>   | <b>58</b> |
| V.7.1. Quantificação das larvas em camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....   | 58        |
| V.7.2. Quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> no tecido hepático de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 59        |
| V.7.3. Quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> no tecido pulmonar de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 60        |
| V.7.4. Quantificação das larvas de <i>Toxocara canis</i> no tecido cerebral de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 61        |
| <b>V.8. Análise histopatologia em camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>   | <b>62</b> |
| V.8.1. Análise da área de infiltrado inflamatório no tecido hepático em camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 62        |
| V.8.2. Análise do espessamento do septo no tecido pulmonar em camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 65        |
| V.8.3. Análise da área de hemorragia no tecido cerebral em camundongos infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....   | 69        |
| <b>V.9. Análise do sangue periférico de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>   | <b>71</b> |
| V.9.1. Caracterização do perfil leucocitário de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....   | 71        |
| V.9.2. Caracterização do perfil eritrocitário e plaquetário de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 73        |
| <b>V.10. Análise da resposta imune leucocitária tecidual em camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>   | <b>74</b> |
| V.10.1. Caracterização da atividade da peroxidase de eosinófilos no tecido hepático, pulmonar e cerebral de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico..... | 74        |
| V.10.2. Caracterização da atividade da mieloperoxidase no tecido hepático, pulmonar e cerebral de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....           | 77        |



|  |            |
|--|------------|
| <b>V.11. Análise da resposta inflamatória sistêmica em camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>           | <b>80</b>  |
| V.11.1. Caracterização do perfil de citocinas plasmáticas de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico .....        | 80         |
| <b>V.12. Análise da resposta inflamatória tecidual em camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....</b>            | <b>82</b>  |
| V.12.1. Caracterização do perfil de citocinas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico ..... | 82         |
| V.12.2. Caracterização do perfil de citocinas no tecido pulmonar de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico ..... | 85         |
| V.12.3. Caracterização do perfil de citocinas no tecido cerebral de camundongos infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico ..... | 88         |
| <b>VI. DISCUSSÃO .....</b>   | <b>90</b>  |
| <b>VII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>102</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>   | <b>121</b> |
| ANEXO I - Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....  | 122        |
| ANEXO II - Artigo submetido no Parasites & Vectors.....  | 123        |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

|           |  |
|-----------|--|
| ACTH      | hormônio adrenocorticotrófico                          |
| AMPK      | proteína quinase ativada por AMP                       |
| BAL       | lavado bronquialveolar                                 |
| BSA       | albumina do soro bovino                                |
| CCZ       | Centro de Controle de Zoonoses                         |
| CEUA      | Comissão de Ética no Uso de Animal                     |
| CK        | creatina quinase                                       |
| CLPs      | proteínas quitinase- <i>like</i>                       |
| cm        | centímetros  |
| COBEA     | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal            |
| CONTROLE  | grupo sedentário sem infecção                          |
| CPV       | capacidade pulmonar vital                              |
| DMSO      | dimetilsulfóxido                                       |
| dpi       | dias pós-infecção                                      |
| EDTA      | ácido etilenodiamino tetra-acético                     |
| EPO       | peroxidase eosinofílica                                |
| EROs      | espécies reativas de oxigênio                          |
| ES        | antígeno secreção-excreção                             |
| EX        | grupo exercitado por 14 dias sem infecção              |
| EX-EX     | grupo exercitado por 28 dias sem infecção              |
| EX-INF    | grupo exercitado previamente e infectado sem exercício |
| EX-INF-EX | grupo exercitado previamente e infectado com exercício |
| HHA       | eixo hipotálamo-hipófise-adrenal                       |
| HTAB      | brometo de hexadeciltrimetilamônio                     |
| INF       | grupo sedentário com infecção                          |
| INF-EX    | grupo exercitado com infecção                          |
| iNOS      | óxido nítrico induzível                                |
| Kg        | kilograma  |
| L1        | larva no primeiro estágio                              |
| L2        | larva no segundo estágio                               |
| L3        | larva no terceiro estágio                              |
| L4        | larva no quarto estágio                                |

|                    |  |
|--------------------|--|
| LMN                | larva <i>migrans</i> neurológica                     |
| LMO                | larva <i>migrans</i> ocular                          |
| LMV                | larva <i>migrans</i> visceral                        |
| LPS                | lipopolissacarídeo                                   |
| LT $\alpha\beta$   | receptores <i>Toll-like</i> de cadeia $\alpha\beta$  |
| LT $\gamma\delta$  | receptores <i>Toll-like</i> de cadeia $\gamma\delta$ |
| M                  | molar  |
| mg                 | miligrama  |
| min                | minutos  |
| mL                 | mililitro  |
| mm                 | milímetro  |
| MPO                | mieloperoxidase                                      |
| N                  | normal   |
| nm                 | nanômetro  |
| NO                 | óxido nítrico  |
| NT                 | neurotoxocarose                                      |
| OPD                | O-fenilenodiamina dihidrocloridrato                  |
| PBS                | solução tampão de fosfato-salino                     |
| PCR                | reação em cadeia da polimerase                       |
| rpm                | rotações por minuto                                  |
| TBS                | solução tampão de tris-salino                        |
| TCE                | traumatismo crânio-encefálico                        |
| T <sub>H</sub>     | T <i>helper</i>                                      |
| TMB                | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina                        |
| T <sub>REG</sub>   | T regulatórias                                       |
| UFMG               | Universidade Federal de Minas Gerais                 |
| VEF                | volume expiratório forçado                           |
| VO <sub>2MAX</sub> | consumo máximo de oxigênio                           |
| $\mu$ L            | microlitro   |
| $\mu$ m            | micrômetro   |

## LISTA DE FIGURAS

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 45 |
| Figura 2. Fotomicrografia do espessamento do septo nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 47 |
| Figura 3. Fotomicrografia da área hemorrágica e de larvas no cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 49 |
| Figura 4. Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 64 |
| Figura 5. Fotomicrografia do espessamento do septo nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....          | 68 |
| Figura 6. Fotomicrografia da área hemorrágica e de larvas no cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....   | 70 |

## LISTA DE GRÁFICOS

---

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 1. Taxa de embrionamento de 685 mil ovos de <i>Toxocara canis</i> . .....  | 42 |
| Gráfico 2. Recuperação das larvas de <i>Toxocara canis</i> em diferentes tecidos de camundongos BALB/c ao longo do tempo.....  | 43 |
| Gráfico 3. Área de lesão do fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> .....  | 44 |
| Gráfico 4. Área de lesão dos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 46 |
| Gráfico 5. Área de lesão do cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....   | 48 |
| Gráfico 6. Níveis plasmáticos de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 52 |
| Gráfico 7. Massa corporal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> . .....   | 54 |
| Gráfico 8. Comprimento nasoanal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> . .....   | 55 |
| Gráfico 9. Desempenho físico pelo volume total de treino de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> . ....  | 56 |
| Gráfico 10. Concentração de lactato plasmático submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> . .....  | 57 |
| Gráfico 11. Quantificação das larvas pelo somatório de larvas recuperadas do cérebro, fígado e pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Gráfico 12. Larvas recuperadas do tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                           | 59 |
| Gráfico 13. Larvas recuperadas do tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                           | 60 |
| Gráfico 14. Larvas recuperadas do tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                           | 61 |
| Gráfico 15. Área de infiltrado inflamatório do fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                       | 62 |
| Gráfico 16. Área de espessamento do septo dos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                       | 65 |
| Gráfico 17. Área hemorrágica do cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                                     | 69 |
| Gráfico 18. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 74 |
| Gráfico 19. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 75 |
| Gráfico 20. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 76 |
| Gráfico 21. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....           | 77 |

|  |    |
|--|----|
| Gráfico 22. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....      | 78 |
| Gráfico 23. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....      | 79 |
| Gráfico 24. Níveis plasmáticos de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 80 |
| Gráfico 25. Níveis plasmáticos de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....             | 81 |
| Gráfico 26. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....   | 82 |
| Gráfico 27. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 no fígado de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....               | 83 |
| Gráfico 28. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....  | 85 |
| Gráfico 29. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....             | 86 |
| Gráfico 30. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ no cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....  | 88 |
| Gráfico 31. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 no cérebro de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.....              | 89 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

|   |    |
|---|----|
| Ilustração 1. Distribuição mundial da Toxocarose humana de 1994 a 2014. ....  | 4  |
| Ilustração 2. Ciclo biológico do parasito <i>Toxocara canis</i> . ....  | 6  |
| Ilustração 3. Fases de desenvolvimentos dos ovos de <i>Toxocara canis</i> . ....  | 8  |
| Ilustração 4. Morfologia de diferentes estágios de <i>Toxocara</i> spp. ....  | 9  |
| Ilustração 5. Funções das células da resposta imune inata durante a resposta de tipo T <sub>H</sub> 2 nas<br>helminthoses. .... | 15 |
| Ilustração 6. Pannel de citocinas da resposta do tipo T <sub>H</sub> 2 nas helminthoses. ....                                   | 16 |
| Ilustração 7. Potenciais mecanismos da imunologia do exercício físico. ....   | 20 |
| Ilustração 8. Divisão dos grupos experimentais da PARTE 1. ....   | 31 |
| Ilustração 9. Divisão dos grupos experimentais da PARTE 2. ....   | 32 |
| Ilustração 10. Delineamento da evolução temporal do experimento da PARTE 2. ....  | 33 |
| Ilustração 11. Sequência experimental do protocolo de exercício físico (natação). ....  | 34 |



## LISTA DE TABELAS

---

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Perfil leucocitário, eritrocitário e plaquetário de camundongos BALB/c infectados por <i>Toxocara canis</i> . .....   | 50 |
| Tabela 2. Perfil leucocitário de camundongos BALB/c infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. ....                | 72 |
| Tabela 3. Perfil eritrocitário e plaquetário de camundongos BALB/c infectados ou não por <i>Toxocara canis</i> e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. .... | 73 |

## RESUMO

---

A toxocarose humana é uma importante zoonose causada pelas larvas de *Toxocara canis*. A infecção ocorre por meio de ingestão acidental de ovos embrionados liberados em fezes de cães. O exercício físico está associado com inúmeros benefícios para a saúde, melhorando a aptidão física e estimulando fatores imunológicos que podem auxiliar a resposta imunológica de combate ao parasito. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi padronizar um modelo experimental de infecção por *T. canis* e avaliar o efeito do exercício físico com intensidade moderada na resposta imunológica na infecção experimental. Foram utilizados camundongos fêmeas adultos (8 semanas) da linhagem BALB/c divididos nos seguintes grupos: Sedentário sem infecção (CONTROLE), Sedentário com infecção (INF), Exercício sem infecção (EX e EX-EX), Exercício com infecção (INF-EX), Infectado com exercício prévio (EX-INF) e Infectado com exercício prévio e treinado (EX-INF-EX). A infecção foi com 100µL de solução contendo 1000 ovos embrionados por via intragástrica (gavage). O treinamento de natação foi realizado na intensidade moderada de exercício físico, sendo classificadas pela duração do treino (1 sessão/dia de 90 minutos sem carga adicional). Os camundongos foram eutanasiados nos 7 e 14 dias pós-infecção (dpi) para caracterização da migração das larvas. O sangue foi coletado para análise hematológica e para determinação do perfil de citocinas sistêmicas. O cérebro, fígado e pulmões foram retirados para análise histopatológica, para determinação do perfil de citocinas tecidual e para recuperação e contagem das larvas. Os resultados mostraram a migração das larvas no fígado com 1 dpi, nos pulmões com 3 dpi e no cérebro a partir de 5 dpi. O tecido hepático apresentou infiltrado inflamatório, o pulmonar mostrou espessamento do septo e o cerebral demonstrou áreas hemorrágicas. A leucocitose, neutrofilia e eosinofilia apareceram a partir de 7 dpi. O aumento das peroxidases de eosinófilos e neutrófilos (EPO e MPO) foi presente nos tecidos analisados. A resposta inflamatória inata/ $T_H17/T_H2$ , com a predominância deste último que foi evidenciado pelo aumento de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, apesar do aumento dos níveis de IL-6 e IL-17. Conclui-se que a infecção por *T. canis* produziu uma resposta pró-inflamatória sistêmica, com a ativação de células efectoras da resposta imune inata e resposta imune  $T_H2$  dominante nas alterações histopatológicas. Além disso, o exercício físico potencializou o sistema imunológico para um padrão de resposta mista  $T_H1/T_H2$  melhorando a capacidade do organismo de tolerar de forma mais adequada os danos causados pelos eventos inflamatórios da infecção por *T. canis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Toxocarose, natação, neutrófilos, IL-6, camundongo

## ABSTRACT

---

Human toxocarose is an important zoonotic disease caused by the larvae of *Toxocara canis*. The infection occurs by accidental ingestion of embryonated eggs released in dog feces. Physical exercise is associated with numerous health benefits, improving physical fitness and stimulating immune factors, which may help the immune response to combat the parasite. Thus, the aim of this study was to standardize an experimental model of *T. canis* infection and to evaluate the effect of physical exercise with moderate intensity in the immune response in experimental infection. Adult females BALB/c mice (8 weeks) were divided into the following groups: Sedentary without infection (CONTROL), Sedentary with infection (INF), Exercise without infection (EX and EX-EX), Exercise with infection (INF-EX), Infected with previous exercise (EX-INF) and Infected with previous exercise and trained (EX-INF-EX). The infection consisted in 100µL of solution containing 1000 embryonated eggs by the intragastric way (gavage). The swimming training was conducted at moderate-intensity exercise, being classified by the training duration (1 session/day with 90 minutes with no extra load). The mice were euthanized at 7 and 14 days post-infection (p.i.) for characterization of the larval migration. The blood was collected for the hematological analysis and to determine the profile of systemic cytokines. The brain, liver and lungs were removed for histopathological analysis, to determine the cytokine profile and to recover and count the larvae. The results showed migrating larvae in the liver with 1 day p.i., in the lungs with 3 days p.i. and in the brain from 5 days p.i. The liver tissue showed inflammatory infiltrate, the lung tissue showed thickening of the septum and the brain tissue demonstrated hemorrhagic areas. The leukocytosis, neutrophilia and eosinophilia appeared from 7 dpi. The increase in the eosinophils peroxidases and neutrophils was present in the analyzed tissues. The innate inflammatory response/ $T_H17/T_H2$ , with the prevalence of the latter, was evidenced by increased IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33, despite the increase in IL-6 and IL-17 levels. The conclusion was that the *T. canis* infection produced a systemic pro-inflammatory response by activating effector cells of the innate immune response and  $T_H2$ -dominant immune response in histopathological changes. In addition, the exercise potentiated the immune system to a standard mixed response  $T_H1/T_H2$  improving the body's ability to tolerate more adequately the damage caused by inflammatory events of *T. canis* infection.

**KEYWORDS:** Toxocariasis, swimming, neutrophils, IL-6, mice

## **I. INTRODUÇÃO**

## I.1. TOXOCAROSE HUMANA

A toxocarose é uma zoonose causada pela infecção em humanos com ovos embrionados de *Toxocara* spp., realizada por ingestão acidental principalmente de *Toxocara canis* (Werner, 1782) e *Toxocara cati* (Schrunk, 1788), os quais são nematoides parasitos de cães e gatos, respectivamente (Macpherson, 2013).

Dependendo da quantidade de ovos embrionados ingeridos e da resposta imune do hospedeiro acidental contra o parasito, a toxocarose pode ser subclínica ou pode desencadear síndromes clínicas causadas pela migração de larvas de *Toxocara* spp. através da corrente sanguínea para qualquer órgão ou tecido, resultando em tosse, febre, dores abdominais, mialgia, urticária, hepatomegalia, linfadenite, leucocitose, eosinofilia, inflamações locais, infiltração eosinofílica e formação de granulomas nos tecidos atingidos (Despommier, 2003).

A classificação da toxocarose humana depende do órgão atingido pelas larvas de *Toxocara* spp. e dos sintomas clínicos, a qual pode ser definida como larva *migrans* ocular (LMO) ou toxocarose ocular, larva *migrans* visceral (LMV) ou toxocarose visceral, toxocarose oculta ou comum e larva *migrans* neurológica (LMN) ou neurotoxocarose (NT) (Fan et al., 2013). Vários estudos tem mostrado que a infecção crônica da toxocarose pode persistir nos até 10 anos no hospedeiro paratênico (Strube et al., 2013; Schoenardie et al., 2012; Pawlowski, 2001).

Essa doença parasitária acomete tanto pessoas de meio social mais favorecido quanto às submetidas à privação social, devido ao aumento de cães e gatos como animais domésticos em todo o mundo (Oge et al., 2014). Normalmente, a toxocarose humana está associada com uma elevada morbidade caracterizada por episódios de febres intermitentes, perda de peso, diarreias, tosse, falta de ar, problemas neurológicos e de visão (Overgaauw, 1997). Essas alterações causadas pelos helmintos das espécies de *Toxocara* exercem efeitos patológicos diretos sobre a saúde, além de afetar a capacidade física e mental, sendo esses, mais deteriorante quanto mais avançado for o estado patológico do hospedeiro acidental (Maizels, 2013; Hotez e Wilkins, 2009).

Quando acontece a infecção por *Toxocara* spp., a resposta imune é mediada principalmente por células T *helper* (T<sub>H</sub>), que são diferenciadas dependendo da produção de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias (Helmby, 2009). No entanto, os helmintos são capazes de controlar a resposta imune do hospedeiro acidental para sobreviver e induzem as células T regulatórias (T<sub>REG</sub>) à produzirem citocinas imunossupressoras. Assim, o sistema imunológico precisa encontrar um equilíbrio cuidadoso entre as respostas pró,

antiinflamatória e regulatória para funcionar de forma eficiente contra a infecção por nematoides sem causar efeitos deletérios no hospedeiro resultante da resposta imune induzida (Maizels e Yazdanbakhsh, 2003; Allen e Maizels, 2011).

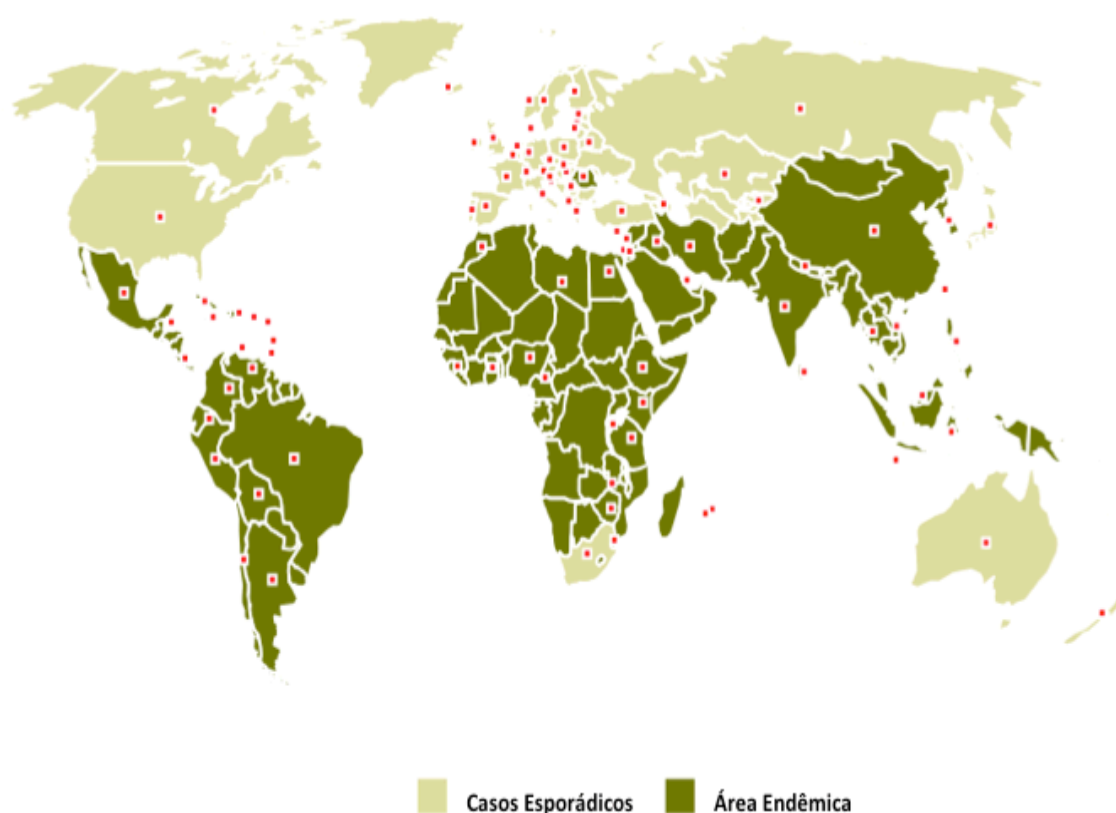
### **I.1.1. Etiologia e Distribuição Mundial**

Os helmintos são metazoários e pertencem ao Reino Animal, no qual o Filo Nematoda compreende os vermes cilíndricos e alongados (Glickman e Schantz, 1981). As espécies *T. canis* e *T. cati* são vermes pertencentes ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Família Toxocaridae, subfamília Ascaridoidae e Gênero *Toxocara* (NCBI taxonomy database 2013). Essas espécies são de importância médica e médico-veterinária, os quais são parasitos com ampla distribuição geográfica e soroprevalência muito variável no mundo (Chen et al., 2012).

De modo geral, esses parasitos são mais prevalentes em países menos desenvolvidos e com clima tropical (Fragoso, 2006) onde o tratamento de animais domésticos como cães e gatos é limitado (Macpherson, 2013). Além disso, o saneamento básico nesses ambientes e ausência de controle anti-helmíntico em animais de estimação promovem a exposição dos seres humanos à estes parasitos (Alcântara-Neves et al., 2014). Desta forma, a toxocarose humana apesar de não ser uma endemia de notificação obrigatória, apresenta grande importância como problema de saúde pública.

Devido ao aumento do número de cães e gatos sendo mantidos como animais de estimação em todo o mundo, infecções por *T. canis* e *T. cati* são as principais causas da toxocarose humana (Overgaauw e van Knapen, 2013). Oge et al. (2014) relataram que a prevalência de *Toxocara* spp. é cosmopolita, ou seja, largamente distribuída mundialmente e varia de 3% a 82% para *T. canis* em cães e de 8% a 91% para *T. cati* em gatos. Despommier (2003) elege as larvas infectantes de *T. canis* como o principal agente etiológico para a toxocarose humana devido ao grande número de cães abandonados na rua nas cidades contaminando o ambiente, além dos mantidos como animais de estimação. Sendo assim, a contribuição e importância das outras espécies de *Toxocara* para a toxocarose humana, como a *T. cati* que tem uma distribuição global semelhante ao *T. canis*, ainda está em discussão (Fisher, 2003; Overgaauw e van Knapen, 2013). Porém, ainda é atual a dificuldade da diferenciação entre as infecções de *T. canis* e *T. cati* pelo diagnóstico sorológico (Chen et al., 2012), devido ao grande número de frações antigênicas comuns e ao comportamento semelhante em hospedeiros acidentais para estas espécies (Cardillo et al., 2009).

Mundialmente, um dos casos mais notórios desta doença foi um surto de toxocarose humana com adultos da mesma família diagnosticados com LMV no Japão, devido a ingestão de fígado bovino cru, mostrando que a ingestão de carne crua de animais paratênicos infectados por *Toxocara* spp. é um importante meio de infecção pelo parasito (Yoshikawa et al., 2008). Da mesma forma, a ingestão de carne suína, bovina e aviária (Schneider et al., 2015; Dutra et al., 2014; Noh et al., 2012; Choi et al., 2012), assim como a ingestão de vegetais crus mal lavados (Avcioğlu et al., 2011) foram identificadas como a causa da toxocarose humana. A ilustração 1 apresenta a distribuição global da toxocarose humana.



**Ilustração 1.** Distribuição mundial da Toxocarose humana de 1994 a 2014. Pontos vermelhos indicam países com registro de casos da doença.

Fonte: GIDEON Informatics, Inc (2015).

A prevalência da toxocarose humana na América Latina varia de 28 a 62%. Nas áreas rurais, a prevalência de animais e solo com *Toxocara* spp. varia de 35 a 42% e nas áreas urbanas, de 2 a 5% (Moreira et al., 2014).

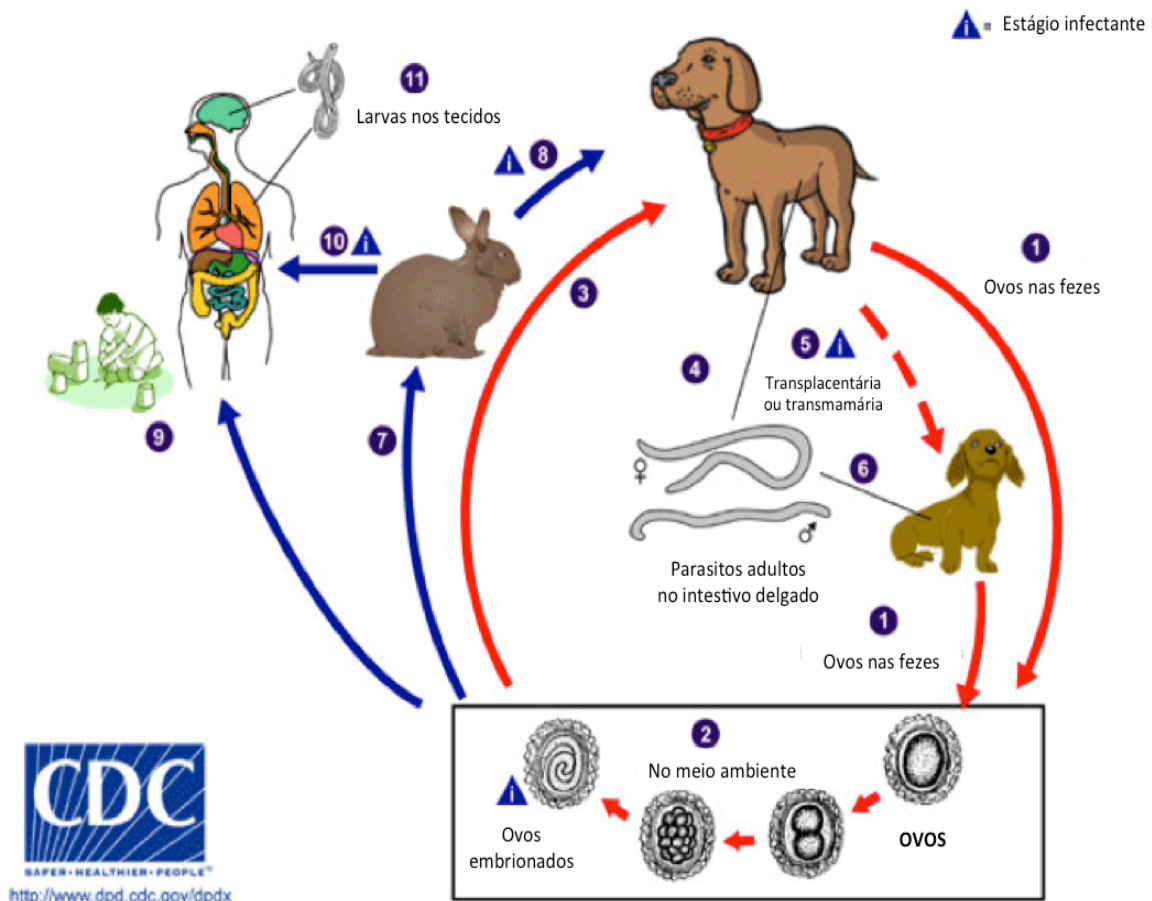
No Brasil, na última década, os estudos de prevalência da toxocarose humana mostraram uma elevada frequência de ovos de *Toxocara* spp. nas areias das praias com 59,4% (Rocha et al., 2011), nas areias dos parques públicos e escolas de 21,4 a 78,6% (Marchioro et al., 2013; Mattia et al., 2012; Manini et al., 2012), nas praças públicas de 9,6 a 100% (Sprenger et al., 2014; Marchioro et al., 2013; Manini et al., 2012; Marques et al., 2012; Mattia et al., 2012; Santarém et al., 2012; Cassenote et al., 2011; Muradian et al., 2005), no solo das regiões rurais com 29,0% (Santarém et al., 2008), nas fezes de cães espalhadas nas cidades com 14,5% (Blazius et al., 2005), nos cães de 8,7 a 82,7% (Heukelbach et al., 2012; Manini et al., 2012; Regis et al., 2011; Katagiri e Oliveira-Sequeira, 2010; Muradian et al., 2005) e nos pêlos dos cães com 24,0% sendo 99,0% destes cães filhotes (Amaral et al., 2010).

Ainda na última década, os estudos de soroprevalência de *T. canis* em humanos no Brasil mostraram uma frequência de 21,5 a 52,0% na região norte (Oliart-Guzmán et al., 2014; Rubinsky-Elefant et al., 2008; Damian et al., 2007; Ferreira et al., 2007a); de 47,0% na região nordeste (Mendonça et al., 2012; Dattoli et al., 2011), de 8,7 a 51,6% na região sudeste (Cassenote et al., 2014; Grama et al., 2014; Fragoso et al., 2011; Santarém et al., 2011; Prestes-Carneiro et al., 2008; Teixeira et al., 2006; Muradian et al., 2005) e de 17,8 a 50,6% na região sul (Manini et al., 2012; Mattia et al., 2012; Schoenardie et al., 2012; Colli et al., 2010; Paludo et al., 2007). Nesses estudos, a soroprevalência nas idades de 0 a 15 anos foi de 8,7 a 51,6% (Cassenote et al., 2014; Grama et al., 2014; Oliart-Guzmán et al., 2014; Manini et al., 2012; Mattia et al., 2012; Mendonça et al., 2012; Schoenardie et al., 2012; Fragoso et al., 2011; Santarém et al., 2011; Colli et al., 2010; Ferreira et al., 2007a; Paludo et al., 2007; Teixeira et al., 2006; Muradian et al., 2005) e de 16 a 76 anos foi de 21,5 a 52,0% (Prestes-Carneiro et al., 2008; Damian et al., 2007).

### **I.1.2. Ciclo Biológico e Transmissão**

Na toxocarose humana os vermes adultos vivem nos tratos intestinais de seus hospedeiros definitivos que liberam grande número de ovos nas fezes e contaminam o ambiente peridoméstico. O homem, como hospedeiro acidental, ingere os ovos contendo a larva infectante de terceiro estágio (L3), a qual eclode no intestino delgado, penetra a parede intestinal e atinge a circulação sanguínea, e durante a migração, as larvas podem atingir qualquer órgão ou tecido (Despommier, 2003). O ciclo biológico de *T. canis* está esquematizado na ilustração 2.





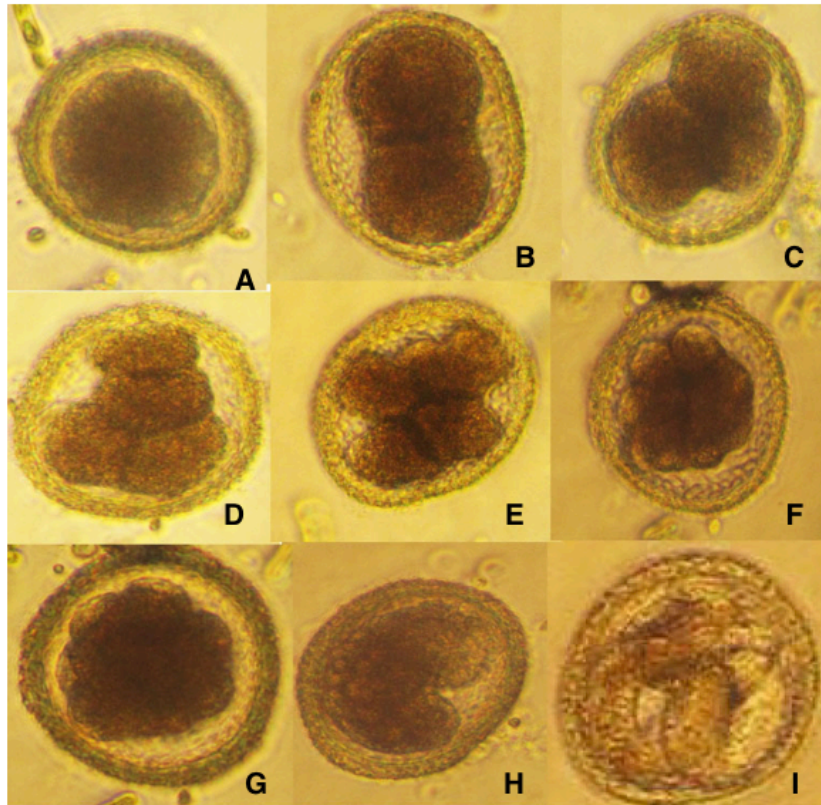
**Ilustração 2.** Ciclo biológico do parasito *Toxocara canis*.  
Fonte: CDC (2015)

As etapas do ciclo biológico mostram: [1] Os ovos não embrionados são eliminados nas fezes do hospedeiro definitivo, o cão. [2] Uma vez no ambiente, os ovos podem sobreviver por até 1 ano em clima frio e por até 4 anos em local fresco e úmido. Em condições adequadas de temperatura (10 a 35°C) e umidade (85-95%), os ovos de *T. canis* contendo a larva no primeiro estágio (L1) se desenvolvem para o segundo estágio (L2) e finalmente evoluem para a forma infectante, que são os ovos contendo a larva no terceiro estágio (L3). O período de desenvolvimento e embrionamento dos ovos pode demorar de 2 a 5 semanas. [3] Após a ingestão de ovos com L3 pelo hospedeiro definitivo, as larvas eclodem no duodeno (dentro de 2 a 4 horas), as larvas liberadas seguem para o intestino e atravessam a mucosa intestinal, invadindo os vasos linfáticos e sanguíneos, migrando para o fígado através da circulação venosa portal (em até 24 horas). Durante o processo de migração, as larvas saem do fígado e atingem o coração, passam para os pulmões (em até 72 horas), as quais via brônquios, já no quarto estágio (L4) atingem a traqueia e faringe; e são deglutidas para o sistema digestório, onde instalam-se no intestino delgado (em até 15 dias). [4] No intestino

delgado, as larvas evoluem para estágio jovem e adulto com capacidade de se reproduzirem (após 1 mês), e assim cada fêmea consegue eliminar 200 mil ovos por dia. [5 e 6] Nos cães mais velhos, as infecções patentes também podem ocorrer, mas o encistamento das larvas nos tecidos é mais comum. Isto acontece quando as larvas presentes nos pulmões retornam ao coração pela parede dos alvéolos e atingem a circulação sanguínea sistêmica e são distribuídas aos tecidos. As fases de encistamento são reativadas em cadelas durante a fase terminal da gravidez e as vias de infecção dos seus filhotes podem ocorrer de forma transplacentária a partir da sexta semana de gestação e a transmamária por até cinco semanas de lactação. Uma vez infectados, os filhotes liberam nas fezes milhões de ovos por dia no ambiente, dependendo da intensidade da infecção por *T. canis*. [7 e 8] Essa infecção também pode ocorrer pela ingestão de pequenos mamíferos (ex. coelho, rato, etc.) infectados por *T. canis*, na qual os cães passam por um período pré-patente de 4 a 5 semanas. Nestes hospedeiros paratênicos, as L3 eclodem dos ovos ingeridos e migram para diversos tecidos onde encistam-se. [9 e 10] Os humanos são hospedeiros acidentais e podem infectar-se quando ingerem os ovos com L3 de *T. canis*, presentes no solo e alimentos contaminados e/ou pela ingestão de carne crua de hospedeiros paratênicos infectados. [11] Nos humanos após a ingestão dos ovos com L3, as larvas eclodem e por migração errática, atingem quaisquer tecidos e órgãos do hospedeiro acidental, podendo permanecer encistadas sem nenhum desenvolvimento (CDC, 2015; Macpherson, 2013; Strube et al., 2013; Schnieder et al., 2013 e 2011; Lee et al., 2010).

### **I.1.3. Morfologia do *Toxocara canis***

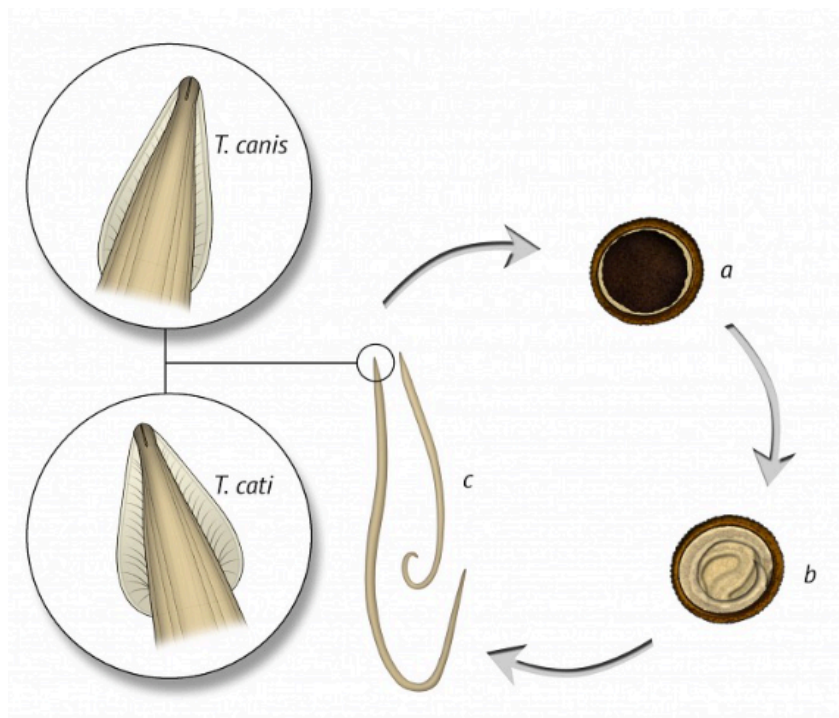
O parasito *T. canis* possui 3 fases evolutivas: ovos, larvas e vermes adulto, macho e fêmea. Os ovos tem cor acastanhada, medem aproximadamente 90 x 75 µm, são ovais, contém uma massa de células germinativas e são típicos por causa da membrana composta por 3 camadas que aumentam a resistência do ovo, sendo a mais externa mamilonada, a média com presença de quitina e proteínas e a interna fina e impermeável a água, composta por lipídeos e proteínas. Os ovos não embrionados são esféricos e com membrana albuminosa (Despommier, 2003). O embrionamento dos ovos podem demorar de 2 a 5 semanas (Zibaei et al., 2010). As fases do desenvolvimento dos ovos de *T. canis* estão demonstradas na ilustração 3.



**Ilustração 3.** Fases de desenvolvimentos dos ovos de *Toxocara canis*.  
A) ovo não embrionado, B-H) fases de embrionamento, I) ovo embrionado ou larvado.  
Retirado de Azam et al. (2012)

As larvas possuem 4 estádios (L1 a L4). As larvas dos estádios L1 a L3 se desenvolvem no meio ambiente e dentro dos ovos, já a L4 se desenvolve dentro do hospedeiro definitivo quando atinge os pulmões (Macpherson, 2013).

Os vermes machos e fêmeas se desenvolvem em 30 dias no intestino delgado do cão. Os vermes são cilíndricos de extremidades afiladas, encobertos por uma cutícula lisa de cor rosada com estriações finas, possuem boca de três lábios com serrilha, esôfago, músculo, intestino retilíneo e reto. Os machos medem de 4 a 10 cm e possuem testículo enovelado, canal deferente, canal ejacular e espículos que funcionam como órgão de cópula; a extremidade posterior é curvada. As fêmeas medem de 6 a 18 cm e possuem dois ovários enovelados (ovidutos), dois úteros e vagina. Na parte anterior dos vermes adultos possuem asas cefálicas estreitas (ilustração 4). Os vermes adultos de *T. canis* vivem em média 4 meses e em cerca de 6 meses eles são eliminados espontaneamente nas fezes do cão (Glickman e Schantz, 1981).



**Ilustração 4.** Morfologia de diferentes estágios de *Toxocara* spp.  
a) ovo não embrionado, b) ovo embrionado, c) vermes adultos.

Fonte: Guerra (2014)

#### I.1.4. Patogênese e Manifestações Clínicas

A infecção por *Toxocara* spp. em humanos foi reportada pela primeira vez por Wilder (1950), o qual encontrou larvas que causaram granuloma eosinofílico na retina de crianças, classificando a doença como LMO. Beaver et al. (1952) encontrou larvas de *Toxocara* spp. no fígado de crianças e chamou a doença de LMV. Outras formas da toxocarose humana como a toxocarose oculta em crianças foi citada pela primeira vez por Bass et al. (1983) enquanto a toxocarose comum em adultos foi por Glickman et al. (1987). Fan et al. (2013) definiu a toxocarose oculta e a comum como sendo a mesma doença. Mikhael et al. (1974) reportou a presença de larvas de *Toxocara* spp. no cérebro de crianças, inicialmente chamada de LMN (Kazacos et al., 1982), porém Pawlowski e Mizgajska (2002) a classificou como NT.

O estudo de Carvalho e Rocha (2011) apresentou as classificações das formas clínicas da toxocarose humana com a intensidade das manifestações clínicas e a sua justificativa para tratamento clínico e preventivo. As formas da toxocarose foram: 1) LMV clássica com intensidade de sintomas alta, sinais moderados, eosinofilia alta e nível de IgE moderado; 2) LMV incompleta com intensidade de sintomas leve, sinais leves, eosinofilia moderada e nível de IgE baixo; 3) LMO com intensidade de sintomas e sinais alta, eosinofilia e nível de IgE

duvidosos; 4) LMN com intensidade de sintomas e sinais leve, eosinofilia e nível de IgE duvidosos; 5) toxocarose oculta com intensidade de sintomas duvidosa, sinais leves, eosinofilia duvidosa e nível de IgE moderado; e 6) toxocarose assintomática sem sintomas e sinais e com eosinofilia e nível de IgE duvidosos. Nesse estudo, o tratamento clínico foi proposto para todas essas formas de toxocarose humana com exceção da toxocarose assintomática; e o tratamento preventivo foi indicado para a LMV incompleta e toxocarose oculta, visto que esses casos são acompanhados de relatos com a convivência com animais de estimação.

As classificações da toxocarose humana indicam que essas doenças se desenvolvem de forma independente, as quais podem ser influenciadas pela idade da pessoa infectada, da carga parasitária e da resposta imune contra o parasito, e também dependem do órgão atingido e da duração da migração (Despommier, 2003). A toxocarose humana é mais prevalente em crianças devido ao seu estreito contato com os animais de estimação e a não conscientização de hábitos de higiene, sendo a LMO mais frequente em crianças entre 8 a 12 anos de idade (Logar et al., 1993; Overgaauw, 1997) e a LMV em crianças menores de 5 anos de idade (Magnaival et al., 2001; Despommier, 2003).

De uma forma em geral, como os humanos são hospedeiros acidentais as larvas de *T. canis*, a fase de migração larvária ocasiona uma reação inflamatória aguda, com presença de eosinófilos, neutrófilos e algumas vezes, monócitos. Também, nesta fase há liberação de metabólitos antigênicos denominados antígenos de secreção-excreção (antígenos ES), incluindo lectinas, mucinas e enzimas que interagem na modulação da imunidade do hospedeiro, além de liberar sua cutícula de revestimento na tentativa de enganar o sistema imune do hospedeiro acidental (Maizels, 2013; Lee et al., 2010).

A LMO acontece em pessoas sem histórico de geofagia e contato com animais de estimação, as quais provavelmente não foram sensibilizadas com anticorpos anti-*Toxocara* spp. (Kazacos, 1991). Geralmente, as manifestações clínicas incluem as lesões oculares de forma unilateral e induzem a formação de granuloma na retina, uveíte e endoftalmite difusa, a qual pode resultar em cegueira (Magnaival et al., 2001). A LMV é mais frequente que a LMO, sendo associada com a infecção por repetição e a alta carga parasitária, a qual apresenta sintomas clássicos de febre, hepatoesplenomegalia, dor abdominal, vômito diarreia, perda de peso, fadiga, desconforto respiratório, tais como tosse, obstrução ao fluxo aéreo, pneumonia eosinofílica (pneumonia de Loeffler) que se assemelha com respostas inflamatórias pulmonares de pessoas asmáticas, eosinofilia e aumento dos níveis séricos de IgE (Obwaller et al., 1998; Feldman e Parker, 1992), e ocasionalmente urticária (Despommier, 2003). A

toxocarose oculta ou comum possui manifestações clínicas assintomáticas, leve ou inespecíficas (Macpherson, 2013), as quais são febre, anorexia, dor de cabeça, dor abdominal, náuseas, vômitos, letargia, distúrbios de comportamento e sono, hepatomegalia, desconforto pulmonar, miosite, síndrome pseudorreumática, doenças dermatológicas com erupção cutânea, urticária crônica, hiperdermatite e vasculite, tanto em crianças quanto em adultos (Fan et al. 2013; Rubinsky-Elefant et al., 2010; Gavignet et al., 2008; Magnaval et al., 1994). Na NT, as larvas de *T. canis* migram para o cérebro e/ou medula espinhal, provocando o desenvolvimento de meningite, encefalite, mielite, vasculite cerebral, convulsões e epilepsia (Caldera et al, 2013; Macpherson, 2013; Quattrocchi et al., 2012).

A toxocarose humana é raramente fatal e sua manifestação clínica está relacionada a migração das larvas e a resposta inflamatórias contra o parasito, as quais podem desenvolver linfomas, hepatite granulomatosa, endomiocardite, endoftalmite, asma, leucocitose incluindo eosinofilia (>30%), manifestações cutâneas, hipergamaglobulinemia da relação IgG/IgE e meningoencefalite (Macpherson, 2013; Despommier, 2003).

### **I.1.5. Diagnóstico**

A toxocarose humana constitui um problema de saúde pública com grande morbidade no Brasil, visto que seu diagnóstico nem sempre é identificado, sendo tratado como alguma doença diferente com sintomas semelhantes. Esse fato representa enorme demanda nos serviços de saúde, com alto gasto de recursos públicos, incluindo atenção médica individual para o problema que pode ser abordado de maneira coletiva e com medidas profiláticas de educação sanitária. Devido a isto, não é uma doença de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2010).

Como *T. canis* não completa o ciclo biológico em humanos, o diagnóstico parasitológico não pode ser feito por exame de fezes mas por outras técnicas diretas ou indiretas, como testes sorológicos, moleculares e por imagem (Macpherson, 2013). O diagnóstico histopatológico não é aconselhável, pelo fato de muitas vezes não permitir a detecção de larvas no material coletado (Nicoletti, 2013).

Os testes imunológicos indiretos detecta anticorpos anti-*Toxocara* spp. no soro, no fluido ocular ou no líquor. Os testes mais aplicados são ensaios imunoenzimáticos de ELISA, *Western blot* e reação em cadeia da polimerase (PCR), usando antígenos solúveis de larvas e vermes adultos ou até mesmo os antígenos excreção-secreção (ES) de *T. canis*, os quais são glicoproteínas imunogênicas e levam ao aumento dos anticorpos IgM, IgG e IgE, assim como

aumento dos eosinófilos (Chieffi et al., 2009). A detecção de antígeno ES de *T. canis* é usado no diagnóstico da toxocarose por kit de diagnóstico comercial, porém a sua sensibilidade é de 91% e especificidade de 86% (Jacquier et al, 1991). Desta forma, os exames laboratoriais, tanto bioquímico quanto hematológico, são sempre requeridos para o diagnóstico complementar da toxocarose humana (Fragoso et al., 2011; Smith et al., 2009).

Muitos dos testes imunoenzimáticos têm mostrado uma alta reatividade cruzada com antígenos ES por causa da detecção do anticorpo IgG de outras helmintoses intestinais, tais como *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis* (Nunes et al., 1997) as quais pode interferir nos resultados em pessoas que foram expostos a outras helmintoses (Turrientes et al., 2011). A avaliação de IgM é inespecífico para a toxocarose humana, visto que esse anticorpo pode ser identificado durante a helmintose, mas a detecção de IgE, IgA e a subclasse IgG4 mostraram ser melhores alvos para diagnosticar a toxocarose humana (Fillaus e Magnaval, 2013).

O diagnóstico da toxocarose por imagem é utilizado para detectar lesões granulomatosas nos tecidos devido a migração errática do parasito (Carvalho e Rocha, 2014). Já foi reportado estudo que utilizou ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (Watthanakulpanich et al., 2008). Na LMO, a fundoscopia para a identificação de lesões oculares é sempre requerida (Glickman e Schantz, 1981). A investigação de novas técnicas de diagnóstico da infecção são sempre alvo de estudos, assim como a utilização antígenos recombinantes específicos, miRNAs dos vermes e antígenos candidatos para o sorodiagnóstico da toxocarose humana (Moreira et al., 2014; Maizels, 2013; Peixoto et al., 2011). Isto acontece devido a dificuldade da efetivação de um diagnóstico fidedigno para a toxocarose, visto a diversidade de manifestações clínicas associadas com os diversos tecidos que as larvas de *Toxocara* spp. podem se instalar no organismo humano (Carvalho e Rocha, 2014).

#### **I.1.6. Tratamento**

Devido a dificuldade de diagnóstico da toxocarose humana e pelo fato de ser uma infecção subclínica que pode persistir por anos, o seu tratamento muitas vezes é inespecífico (Magnaval et al., 2001). A terapia anti-helmíntica contra a toxocarose foi abordada no estudo de Othman (2012), o qual mostrou o espectro dos medicamentos tiabendazol, mebendazol, albendazol, ivermectina contra a infecção por *T. canis* em humanos. Ele comprovou a propriedade larvicida na fase inicial da infecção dos medicamentos tiabendazol, mebendazol e

albendazol, sendo este último mais utilizado contra a toxocarose humana devido aos poucos efeitos colaterais e por atravessar a barreira hemato-encefálica (Rubinsky-Elefant et al., 2010). Nas formas não neurológicas e oculares da toxocarose, o tratamento com tiabendazol foi mais eficaz que o com albendazol e mebendazol, os quais precisaram de várias doses para exterminar o parasito (Othman, 2012).

A ivermectina é mais utilizada no tratamento de cães infectados por *T. canis* e mostra ser bastante eficiente. Porém em humanos, a ivermectina não mostrou ser capaz de reduzir as manifestações clínicas da toxocarose, principalmente no que tange à eosinofilia (Magnaval, 1998). Os medicamentos levamisol, tinidazol e nitazoxanida mostraram eficácia para reduzir as larvas no cérebro em camundongos, sendo melhor indicado para a NT, que o albendazol e a ivermectina. Porém em humanos sugere-se mais testes devido ao efeito colateral destes medicamentos (Othman, 2012).

A intervenção imunológica com células T<sub>REG</sub> e a corticoterapia também são utilizados no tratamento da toxocarose humana para modular a resposta inflamatória à infecção por *T. canis*, porém ainda é discutido a eficácia desses tratamentos (Barry et al., 2012; Othman et al., 2011). Na LMO, os medicamentos antiinflamatórios são obrigatoriamente prescritos para minimizar as lesões oculares provocadas pelo sistema imune na tentativa de eliminar o parasito (Moreira et al., 2014).

O tratamento da toxocarose humana ainda é controverso, devido a dificuldade de estabelecer um consenso sobre qual terapia utilizar, qual a dose ideal e qual a duração do tratamento. Desta forma, o parâmetro mais importante da cura é a resposta das manifestações clínicas do paciente, sendo necessário a realização de exames clínicos para monitoramento da eficácia do tratamento (Othman, 2012).

### **I.1.7. Profilaxia**

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 1990) emitiu recomendações para reduzir a infecção de *Toxocara* spp. em humanos, as quais aconselham: 1) eliminar as fezes de cães e gatos de locais públicos como parques, praças, etc., pois assim pode reduzir a contaminação do solo com os ovos do parasito; 2) melhorar a higiene no preparo dos alimentos; 3) conscientizar as pessoas sobre a educação sanitária; 4) reduzir a população canina vadia; 5) promover a higiene a vermifugação de cães e gatos vadios e diagnosticados com o parasito.

A higienização dos animais de estimação é fundamental, visto que estudos mostram a presença de ovos de *T. canis* no pêlo de cães (Keegan e Holland, 2013 e 2010). Carvalho e



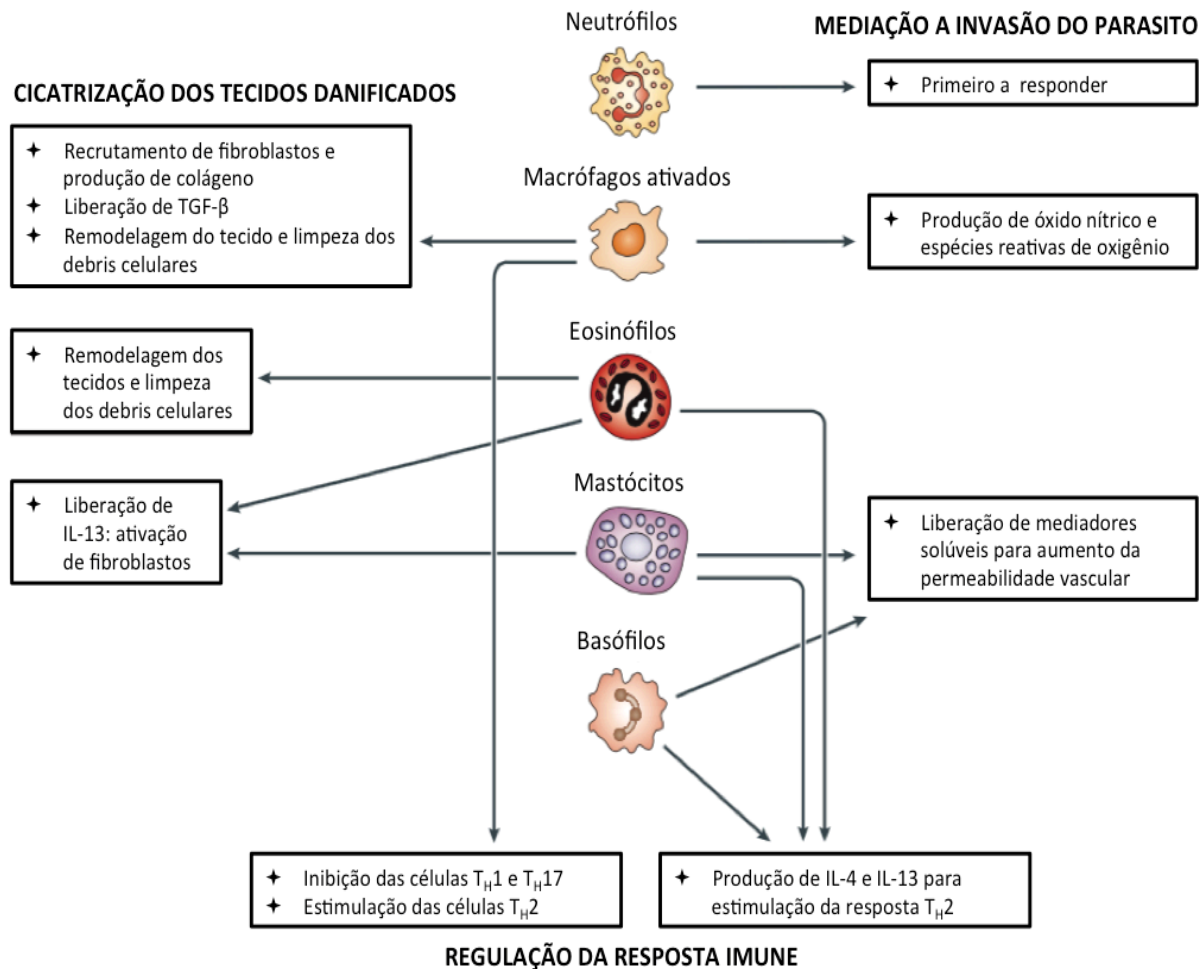
Rocha (2014) ainda sugerem o controle sanitário de empresas que comercializam areia, principalmente para uso em parques infantis, reduzindo assim as chances de acontecer a toxocarose em crianças.

## **I.2. RESPOSTA IMUNE NA TOXOCAROSE HUMANA**

A resposta imune à infecção por helmintos tem a participação primordial dos monócitos/macrófagos, eosinófilos, linfócitos e seus subtipos, as células  $T_H$  (Evengård, 1989). Na infecção por *T. canis*, durante a migração das larvas, os antígenos ES que levam à ativação do sistema imunológico do hospedeiro, gerando mecanismos imunopatogênicos que originam as manifestações clínicas da doença (Bashi et al., 2015). A resposta imune contra o helminto desencadeia principalmente mecanismos efetores por linfócitos T do tipo  $T_H2$ , que segregam IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, envolvidas na ativação de mastócitos, eosinófilos, monócitos/macrófagos e níveis elevados de produção de anticorpos IgE que diminuem as células inflamatórias do tipo  $T_H1$  reduzindo a excreção de  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  e IL-17 (Maizels, 2013).

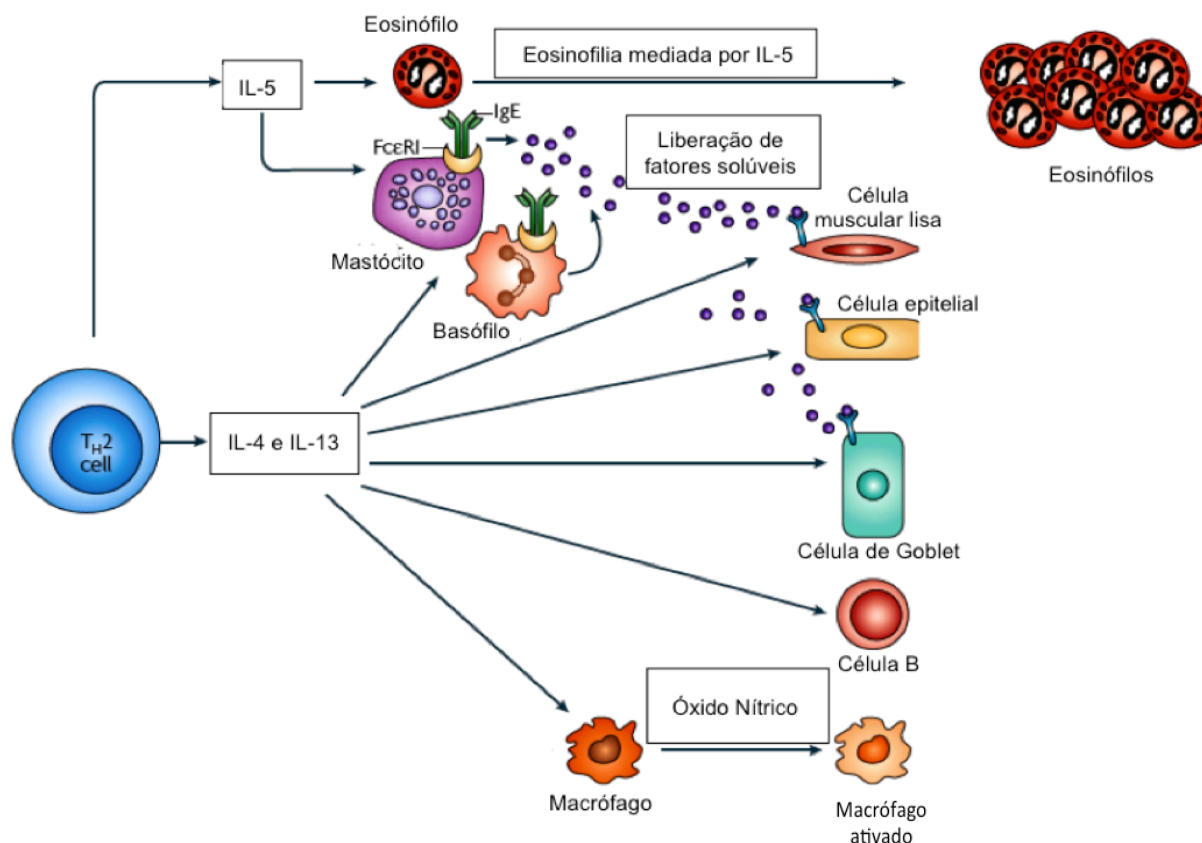
A células da resposta imune inata auxiliam a resposta  $T_H2$  na cicatrização dos tecidos danificados pela migração das larvas de *T. canis* pela participação dos macrófagos ativados e eosinófilos; na mediação à invasão do parasito pelos neutrófilos, mediadores solúveis como leucotrienos, prostaglandinas e histamina dos basófilos e mastócitos, produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos macrófagos ativados; e na regulação da resposta imune pelos macrófagos liberando citocinas de inibição das células  $T_H1$  e  $T_H17$  e de estimulação das células  $T_H2$ , assim como a amplificação da sua resposta pela produção de IL-4 e IL-13 pelos eosinófilos, basófilos e mastócitos (Anthony et al., 2007), conforme ilustração 5.

Na infecção por *T. canis*, a formação de granuloma é considerada uma manifestação mediada por  $T_H1$ , enquanto que a produção de IgE e eosinofilia são características de resposta do tipo  $T_H2$ . Os eosinófilos seriam importantes na eliminação de helmintos, visto que essas células aderem à superfície do parasito por meio dos receptores do sistema complemento e secretam grânulos com enzimas que podem destruí-los (Elliott e Weinstock, 2012; Maizels e Smith, 2011).



**Ilustração 5.** Funções das células da resposta imune inata nas helmintoses.  
Adaptado de Anthony et al. (2007).

De uma forma em geral, a resposta imune contra o parasito *T. canis* mostra que a participação das células  $T_H1$  leva à formação de granulomas, mas existe uma predominância de participação das células  $T_H2$ , e do seu painel de citocinas específicas as quais contribuem com a produção de IgE e aumento e recrutamento de eosinófilos (Ilustração 6). Essa resposta pode levar às manifestações alérgicas atópicas (Pawlowski, 2001) e também predispor o organismo à desenvolver asma (Cooper, 2008; Buijs et al., 1997). Esses efeitos na toxocarose humana contradizem a hipótese da higiene, a qual propõe que as infecções helmínticas minimizam a alergia e outras imunopatologias por suas propriedades imunossupressoras (Helmby, 2009). Isto é justificado pelo fato do humano ser o hospedeiro acidental do parasito *T. canis*, no qual o seu sistema imune pode reagir patologicamente a esta helmintose (Maizels, 2013).



**Ilustração 6.** Painel de citocinas da resposta do tipo T<sub>H</sub>2 nas helmintoses. Adaptado de Anthony et al. (2007).

Os efeitos locais e sistêmicos da infecção helmíntica na resposta imune do hospedeiro são mediados principalmente pelos antígenos ES. Esses antígenos podem inibir os efeitos dos eosinófilos e são capazes de induzir o recrutamento de macrófagos ativados. No entanto, os antígenos ES são uma mistura complexa de diferentes componentes moleculares, os quais necessitam de uma melhor caracterização dos seus efeitos imunomoduladores (Giacomin et al., 2008).

Na resposta humoral, frente as infecções helmínticas, são desenvolvidos anticorpos séricos da subclasse IgG1, com níveis significativos de IgM e IgE; e quando o parasito instala nos tecidos é desenvolvidos anticorpos IgG4 (Maizels et al., 2012). Esse isotipo IgG4 é mais acentuado nas manifestações de LMV, devido a retenção das larvas de *T. canis* nos tecidos (Obwaller et al., 1998).

Vários estudos mostram que os parasitos podem secretar agentes antiinflamatórios que suprimem o recrutamento e ativação de leucócitos efetores, além de produzirem enzimas que clivam os anticorpos. Desta forma, os vermes são capazes de controlar o sistema imunitário

do hospedeiro acidentais para sobreviver pela indução de células T<sub>REG</sub> (Allen e Maizels, 2011; Maizels e Yazdanbakhsh, 2003), especificamente, o *T. canis* ativa a via das T<sub>REG</sub> pela secreção de TGF- $\beta$  (Fan et al., 2013).

### **I.3. IMUNOLOGIA DO EXERCÍCIO FÍSICO**

A imunologia do exercício investiga como o exercício físico modula a resposta imunológica inata e adaptativa frente as infecções e doenças crônicas-degenerativas. O exercício físico proporciona um estresse metabólico, no qual os sistemas fisiológicos e bioquímicos precisam se reajustarem para reestabelecer a homeostase do organismo (Resende et al., 2011) e este reajuste pressupõe a contribuição do sistema imunológico.

O exercício físico está associado com inúmeros benefícios para a saúde física e mental e tem sido recomendada a sua prática regular para a prevenção e reabilitação de doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas, por diferentes associações de saúde no mundo, como o *American College of Sports Medicine*, o *National Institutes of Health* e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (Haskell et al., 2007; Slentz et al., 2005).

Dentre os efeitos benéficos do exercício físico estão a prevenção e tratamento da hipertensão arterial, resistência à insulina, diabetes, dislipidemia, obesidade, doenças pulmonares e neurodegenerativa (Moga et al., 2012; Deslandes et al., 2009), assim como na melhora da aptidão física e cognitiva nas parasitoses (Japyassú et al., 2012; Fiore et al., 2002). Porém a maior contribuição do exercício físico está no seu potencial de alterar a função dos parâmetros imunes, sejam eles, na quantidade de células e/ou tipo de resposta imunológica celular (Ortega, 2003).

A resposta imunológica ao exercício físico parecer ser essencialmente gerada por dois principais fatores, a ativação neuroendócrina e o dano muscular causado pelo gesto motor durante a realização do exercício físico (Gleeson et al., 2011). Porém a intensidade, duração e frequência do exercício físico são determinantes para intensificar a resposta neuroendócrina e modular as funções efetoras das células do sistema imune (Elenkov e Chrousos, 2002; Woods, 2000). A magnitude da imunologia do exercício físico depende do tipo de exercício realizado, sua intensidade e duração; nível de condicionamento físico e memória metabólica atlética do praticante; e fatores ambientais como local e horário da realização do exercício (Nieman, 1998).

O exercício físico pode gerar resposta imune de efeito agudo à uma única sessão e outras a médio e longo prazo de efeito crônico (Nieman e Bishop, 2006). Na prática de exercício físico ocorre a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do sistema autônomo simpático. O HHA libera o hormônio liberador de corticotropina que secreta o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) o qual atua na liberação dos glicocorticoides pelo córtex adrenal, como o cortisol. Nessa fase inicial, surge a sinalização de reações inflamatórias mediadas pela TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, liberadas por monócitos e macrófagos, conhecida como a fase de estresse inflamatório no exercício físico (Pedersen, 2009). Essas citocinas pró-inflamatórias são segregadas em cascata, na qual TNF- $\alpha$  estimula IL-1, que juntas promovem a liberação de IL-6. Todas essas citocinas estimulam a sua própria secreção, de forma autócrina pelas células que as produzem (Starkie et al., 2003).

As catecolaminas, epinefrina e norepinefrina, liberadas de forma dependente da intensidade e duração do exercício físico pelos impulsos dos neurônios aferentes na contração muscular, também estimulam a IL-6 por meio dos receptores  $\beta$ 2-adrenérgico nas células T, B NKs, macrófagos e neutrófilos (Nagrão et al., 2000). A IL-6 aumenta as concentrações de ACTH e cortisol através da ativação do eixo HHA, assim com TNF- $\alpha$  e IL-1, ou pela combinação das três citocinas que podem também ativar o HHA (Bergmann et al., 1999).

Durante e logo após a prática de exercício físico, o sistema nervoso simpático e as catecolaminas estão fortemente ligados à função imunológica, principalmente no aumento das células da resposta imune inata e linfócitos T CD8 e B (Mastorakos et al., 2005). Os exercícios físicos de intensidade moderada demonstraram que imediatamente pós-exercício ocorre uma moderada leucocitose, linfocitose e neutrofilia, assim como uma moderada linfocitopenia durante a fase de recuperação. Esse comportamento é exacerbado na prática de exercício com intensidade mais elevada, no qual ocorre uma intensa leucocitose, principalmente de células NKs, seguida de uma intensa linfocitopenia no período de recuperação (Nieman e Pedersen, 1999; Nieman et al., 1994). Nesse período acontece uma imunossupressão transitória chamada de “janela aberta ou imunológica”, na qual deixa o organismo susceptível as infecções, principalmente nas vias aéreas superiores, de 3 a 72 horas pós-exercício (Nieman e Pedersen, 1999). Porém o exercício físico com intensidade moderada não provoca diminuição da capacidade imunológica e portanto não é observado essa imunidade alterada transitória (Nieman, 1998; Nieman e Bishop, 2006).

O cortisol tem sido relacionado como um imunossupressor durante a recuperação do exercício de intensidade intensa, assim como causador de neutrofilia, eosinopenia e linfopenia, além da supressão de células NKs e T. Esse hormônio e as catecolaminas podem

estimular o perfil de citocinas antiinflamatórias pela resposta  $T_H2$  em consequência ao exercício físico, assim como IL-10 a partir das células  $T_{REG}$  (Bergmann et al., 1999).

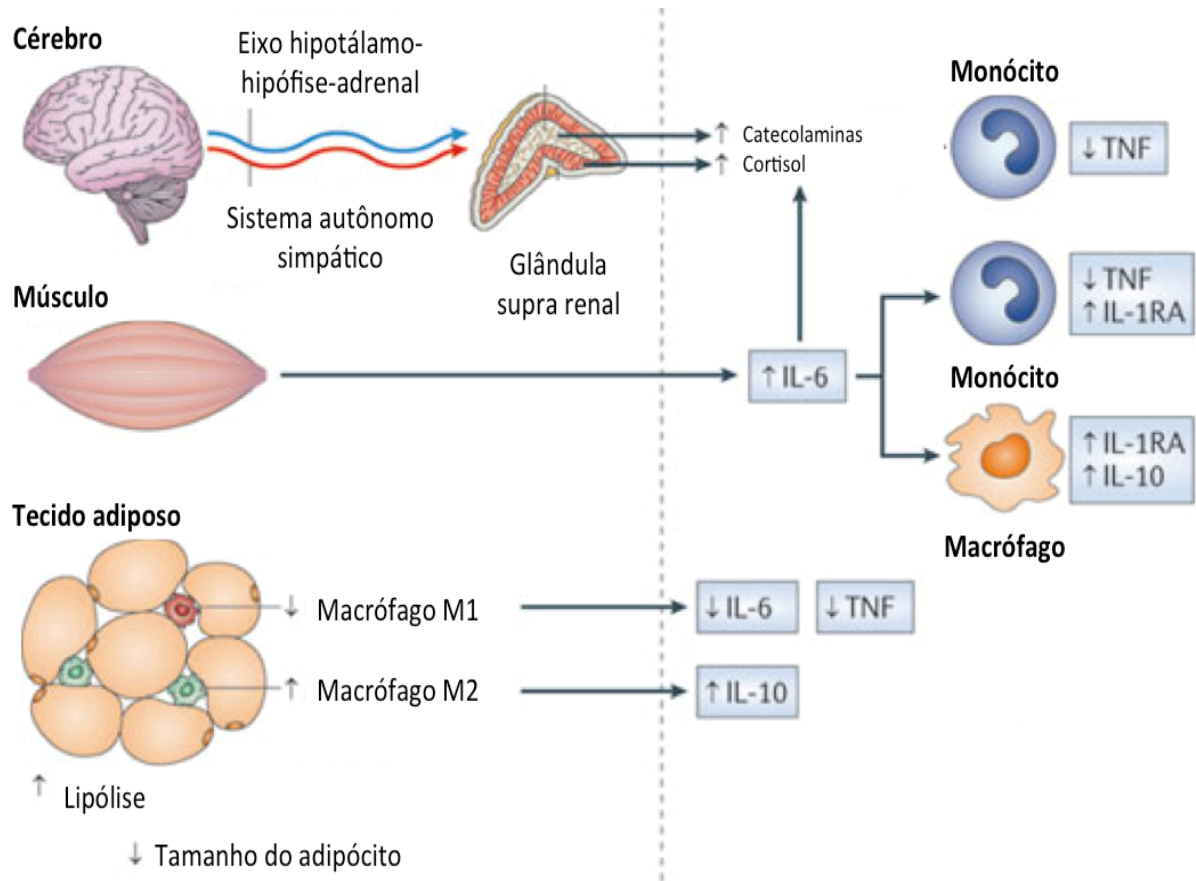
As contrações musculares durante a prática de exercícios físicos podem induzir microlesões na musculatura esquelética, e desta forma, levam ao extravasamento do conteúdo das células musculares lesionadas para a corrente sanguínea, como a elevação da creatina quinase (CK) plasmática. Esse dano tecidual conduz uma resposta imunológica caracterizada por uma linfocitose, com presença prioritária de neutrófilos e monócitos, mediada por citocinas, como IL-4, IL-6, IL-7 e IL-15 devido a ativação da sinalização dos TLRs. Essas citocinas estão envolvidas no processo de miogênese, hiperplasia e hipertrofia muscular (Pedersen e Febbraio, 2012).

Durante a prática prolongada de exercícios extenuantes sem o descanso adequado, o processo inflamatório pode se tornar crônico, e nessa fase os monócitos ativados liberam grandes quantidade de citocinas pró-inflamatórias, especialmente as IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Gleeson et al., 2011). A IL-6, principal miocina (Pedersen e Fischer, 2007), parece apresentar tanto efeito pró-inflamatório em resposta aguda ao exercício, como antiinflamatório estimulando a síntese de cortisol e de citocinas IL-10 e IL-1RA nos macrófagos, essa última é antagonista do receptor da IL-1 e exerce função antiinflamatória (Gleeson et al., 2011; Smith et al., 2011).

A IL-6 promove a ação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), essa proteína é responsável pela ativação de vias que aumentam a síntese de ATP, como a glicólise, gliconeogênese e oxidação de ácidos graxos utilizados como fonte energética durante o exercício físico (Petersen e Pedersen, 2005; Carling, 2004). O aumento da lipólise pode inibir a infiltração de macrófagos para os adipócitos e diminuir o estado de inflamação desencadeado pelo aumento do tamanho dos adipócitos. Os macrófagos infiltrados no tecido adiposo são de dois tipos, o M1, que conseguem produzir TNF- $\alpha$ , IL-6 e óxido nítrico; e M2 que produzem citocinas anti-inflamatórias e arginase. O exercício físico parece conduzir a mudança fenotípica de M1 para M2, contribuindo para a resposta antiinflamatória (Lumeng et al., 2007), conforme ilustração 7.

O aumento na carga de treino, seja por aumento da intensidade ou duração do exercício físico, modula as populações de linfócitos T e B, diminuindo as células do perfil  $T_H1$  e aumentando a síntese de células B. Porém o exercício de intensidade intensa diminui a secreção de IgA, IgA1 e IgM na saliva aumentando a susceptibilidade as infecções, enquanto o exercício de intensidade moderada não provoca alterações significativas nesses anticorpos (Gleeson e Pyne, 2000). Porém, os exercícios de intensidade intensa parecem ser

estimuladores potentes das funções efectoras dos macrófagos, como a fagocitose, atividade antitumoral e quimiotaxia (Woods, 2000).



**Ilustração 7.** Potenciais mecanismos da imunologia do exercício físico.  
Adaptado de Gleeson et al. (2011).

Com a prática contínua do exercício físico ocorre diminuição das células inflamatória ocasionada pela adaptação metabólica ao estímulo inicialmente estressante. Nesta fase aparece um perfil reduzido de citocinas pró-inflamatórias, uma leve neutrofilia pós-exercício e aumento de células dendríticas. Assim, a estimulação de uma resposta inflamatória provocada pelo exercício físico é inversamente proporcional ao condicionamento físico do praticante (Gleeson et al., 2011).

### I.3.1. Exercício Físico nas Helmintoses

A redução da aptidão física pode ter muitas causas, dentre elas, a anemia, desnutrição e infecções crônicas como as infecções causadas por helmintos. Bustinduy et al. (2011) avaliaram as associações entre poliparasitismo e anemia com aptidão física em crianças e jovens do Quênia na África Oriental com idade entre 5 a 18 anos, pelo teste de Shuttle Run com 20 metros, o qual consiste em trotar por 20 metros indo-e-vindo até a exaustão voluntária para estimação do valor do consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2MAX}$ ). Os resultados mostraram que tanto o poliparasitismo, caracterizado pela presença de *Schistosoma haematobium*, *Wuchereria bancrofti*, *Trichuris trichiura* e *Ascaris lumbricoides* (nematóide assim como o *T. canis*, pertencente à ordem Ascaridida); e a anemia diminuíram a aptidão física das crianças.

O estudo de Yap et al. (2012), também avaliou a aptidão física pelo teste de Shuttle Run com 20 metros em crianças e jovens poliparasitados de 8 a 15 anos de idade. Os resultados mostraram que das 69 crianças avaliadas, 44% estavam infectadas com *A. lumbricoides*, e essas apresentaram menor valor de  $VO_{2MAX}$  quando comparadas com crianças e jovens não parasitados.

A propósito da ascaridose, no estudo de Perzanowski et al. (2002), o teste de 6 minutos de corrida livre foi utilizado com instrumento de indução da broncoconstrição para avaliação dos sintomas da asma e sua relação com a resposta imune à alergênicos em crianças com média de 11 anos de idade infectadas por *A. lumbricoides*, de uma área urbana e outra rural do Quênia na África Oriental, em comparação com crianças sem infecção de Atlanta, Georgia nos Estados Unidos da América (EUA). A espirometria foi utilizada para avaliação da capacidade pulmonar vital (CPV) e do volume expiratório forçado (VEF) após o exercício físico. Os resultados mostraram que as crianças com ascaridose tiveram valores significativamente ( $p < 0,001$ ) menores para VEF. Esse mesmo desenho experimental já tinha sido realizado na década de 70 por Craswell et al. (1976) na Tanzânia da África Oriental, com crianças com idade de 10 a 14 anos, asmáticas e poliparasitadas com *Ascaris* spp., *Schistosoma* spp., *Taenia* spp. e *Enterobius vermicularis*.

O estudo de Hagel et al. (2007) também utilizou o teste de 6 minutos de corrida livre e mostrou que crianças com média de 9 anos de idade, de escolas rurais e urbanas de Caracas na Venezuela, infectadas por *A. lumbricoides* apresentaram aumento na hiperreatividade brônquica após exercício físico, mostrando a resposta inflamatória aguda a infecção hemíntica. Esse mesmo achado foi confirmado no estudo de Stevens et al. (2011) com



crianças com média de 12 anos de idade, de comunidades ricas e pobres do Gana na África ocidental, assim como no estudo de Calvert e Burney (2010) com crianças com 8 a 12 anos de idade, de 18 escolas rurais e 6 escolar urbanas da África do Sul, porém eles mostraram que não houve diferença na resposta da hiperreatividade brônquica nas crianças parasitadas e nas com doenças atópicas, as quais apresentavam altos níveis de IgE total no sangue. Vários estudos mostram que essa hiperreatividade brônquica não é encontrada (ou é diminuída) após tratamento com anti-helmíntico, como o albendazol (Flohr et al., 2010; Endara et al., 2010).

Desta forma, os estudos vem mostrando que as helmintoses podem causar a redução da aptidão física e consequentemente levar a inatividade física e sedentarismo, oportunizando o desenvolvimento de doenças. A influência do exercício físico na toxocarose em modelos humano e animal ainda não foi apresentada como foco de investigações científicas.

No modelo animal, principalmente nos roedores, tanto o exercício físico voluntário quanto o forçado possuem a capacidade de proporcionar os benefícios advindos da sua prática (van Praag et al., 1999, van Praag, 2008). Entretanto, a vantagem em se utilizar o exercício físico forçado consiste na possibilidade de quantificar o treinamento, através do controle das variáveis do treinamento como o volume, a intensidade e a frequência do treino físico.

Apesar de se conhecer estes aspectos sobre helmintos e aptidão física, pouco se sabe ainda sobre os mecanismos imunológicos e moleculares da toxocarose humana frente ao organismo fisicamente treinado. Desta forma, na tentativa de compreender esses mecanismos, este estudo propôs avaliar em modelo murino infectado por *T. canis*, os efeitos do exercício físico na carga parasitária e na modulação da resposta imunológica à esta infecção.

## **II. JUSTIFICATIVA**

As infecções produzidas por nematoides estão associadas à uma baixa mortalidade e uma alta morbidade, nas quais estudos epidemiológicos mostram que os parasitos do gênero *Toxocara* são de grande impacto na saúde humana e animal. Este gênero compreende mais de 20 espécies, porém o agente etiológico principal no desenvolvimento da toxocarose humana é o *T. canis* (Despommier, 2003; Overgaauw, 1997).

Devido a não usual e/ou inadequada vermifugação dos cães, assim como o aumento deles como animais de estimação, a toxocarose humana alcança elevadas taxas de infecção pelo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, com populações nas áreas rurais em precárias condições de higiene (Chen et al., 2012). As complicações da doença usualmente ocorrem quando há um comprometimento do equilíbrio dos mecanismos imunológicos na relação parasito-hospedeiro, o que a torna uma importante zoonose cosmopolita, cuja a infecção se dá por meio de ingestão acidental de ovos embrionados liberados nas fezes de cães (Schantz, 1898).

Vários estudos têm mostrado que as helmintoses podem causar a redução da aptidão física e consequentemente levar ao estado de inatividade física e sedentarismo, oportunizando o desenvolvimento de doenças (Yap et al. 2012; Bustinduy et al. 2011; Hagel et al. 2007; Perzanowski et al., 2002).

A prática regular de exercício físico parece ser capaz de promover um efeito protetor contra as doenças associadas à inflamação (Pedersen e Febbraio, 2012; Moga et al., 2012; Deslandes et al, 2009). Isto se deve a indução de um ambiente antiinflamatório em resposta a prática de exercício físico (Gleeson et al., 2011).

As infecções experimentais contribuem para a compreensão de uma resposta imune efetiva contra nematoides, além de adicionar diferentes aspectos da imunologia à infecção (Gaze et al., 2014). Diante disso, acredita-se ser relevante o estudo da infecção por *T. canis* em camundongos como um modelo experimental que pode ser extrapolado para a melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos da toxocarose humana.

### **III. OBJETIVOS**

### III.1. Objetivo Geral

Padronizar um modelo experimental de infecção por *Toxocara canis* e avaliar o efeito do exercício físico com intensidade moderada na resposta imunológica na infecção experimental.

### III.2. Objetivos Específicos

Para alcançar o objetivo geral deste estudo, foi necessário dividi-lo em 2 partes. A PARTE 1 foi a **determinação do protocolo de infecção por *T. canis***, a qual apresentou os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecer o protocolo de cultivo e infecção experimental por *T. canis*.
- Realizar a infecção experimental por *T. canis* em camundongos.
- Recuperar larvas de *T. canis* nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral nos camundongos infectados.
- Analisar a histopatologia dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral nos camundongos infectados.
- Caracterizar o perfil hematológico, leucocitário e plaquetário nos camundongos infectados.
- Caracterizar o perfil de citocinas séricas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos camundongos infectados.

A PARTE 2 foi a **verificação do efeito do exercício físico moderado na infecção experimental por *T. canis***, a qual apresentou os seguintes objetivos específicos:

- Realizar a infecção experimental por *T. canis* em camundongos.
- Analisar o desempenho físico e a intensidade de esforço do protocolo de exercício físico pela mensuração do lactato sanguíneo em camundongos infectados ou não por *T. canis*.
- Analisar o desenvolvimento corporal pela pesagem da massa corporal e medida do comprimento nasoanal) em camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.

- Quantificar as larvas presentes nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral em camundongos infectados por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.
- Analisar a histopatologia dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral em camundongos infectados por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.
- Caracterizar o perfil hematológico, leucocitário e plaquetário em camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.
- Analisar a resposta imune leucocitária dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral em camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico, pela atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) e da mieloperoxidase (MPO).
- Caracterizar o perfil de citocinas séricas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.
- Caracterizar o perfil de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral em camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **IV.1. Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

Todo o experimento foi realizado de acordo com os padrões de cuidados com os animais, definidos pelas normas e diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo nº 181/2013 (Anexo I).

#### **IV.2. Animais**

Os animais utilizados tanto na PARTE 1 quanto na PARTE 2 deste estudo, foram camundongos fêmeas adultos (8 semanas) da linhagem BALB/c, provenientes do Biotério Central da UFMG.

Durante todo o período experimental, os animais receberam ração comercial para roedores (Labina<sup>®</sup>) previamente autoclavada e água filtrada *ad libitum*, e foram mantidos em gaiolas coletivas com maravalha autoclavada em condições controladas de luminosidade (ciclo claro-escuro 12 horas). Os animais foram submetidos previamente ao tratamento com dose única subcutânea no dorso de 3 µg/g de Ivermectina (Chemitec Agro<sup>®</sup>) e foram acondicionados em espaço separado (quarentena) até a certificação da isenção de infecções. Após o término do tratamento, os animais foram transferidos para o biotério de experimentação e tiveram um intervalo de 10 dias antes da infecção experimental por *T. canis* devido ao possível efeito residual da Ivermectina sobre a infecção.

#### **IV.3. Infecção Experimental por *Toxocara canis***

##### **IV.3.1. Parasito**

Os vermes adultos de *T. canis* foram coletados do intestino delgado de carcaças de cães eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da Prefeitura de Belo Horizonte em colaboração com as autoridades e os veterinários locais, conforme o projeto “Estudo epidemiológico e endoparasitoses em cães de rua com potencial para zoonoses humanas na Região Metropolitana de Belo Horizonte” (aprovado pelo CEUA/UFMG, sob o protocolo nº 165/2012). Após triagem no CCZ, também foram coletados vermes adultos nas fezes de animais rotineiramente tratados com anti-helmíntico Top-Dog (Ourofino<sup>®</sup>) na dosagem de 1 comprimido via oral de 250 mg/Kg do animal.



Os vermes foram lavados 3 vezes com solução tampão de fosfato-salino (PBS) pH 7,2 e 1 vez com PBS contendo antibióticos (penicilina, estreptomicina, anfotericina- $\beta$ ). As fêmeas foram dissecadas em placa de Petri e o último terço distal do verme foi aberto com bisturi com lâmina de aço nº 22, o útero removido e macerado em crisol de porcelana com solução de ácido sulfúrico a 0,2 M e filtrado em tamis Tyler 100 (0,15 mm). A solução de ácido sulfúrico a 0,2 M com os ovos foi distribuída em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em volume total de 150 mL e com tampa ventilada com filtro de 0,22  $\mu$ m e superfície interna não tratada. As culturas foram incubadas por 30-40 dias à 28°C e agitadas diariamente.

Após incubação, os ovos larvados foram transferidos em tubos cônicos de 50 mL, centrifugados a 600 g por 10 minutos e lavados 3 vezes com PBS para remoção da solução de ácido sulfúrico. O sobrenadante foi descartado e no sedimento (ovos) foi adicionado hipoclorito de sódio 5% na proporção aproximada de 1:1, os quais ficaram incubados em estufa climatizada (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) por 2 horas para romper a camada exterior do ovo e, conseqüentemente, facilitar a eclosão das larvas após a inoculação dos ovos.

#### IV.3.2. Inoculação dos ovos

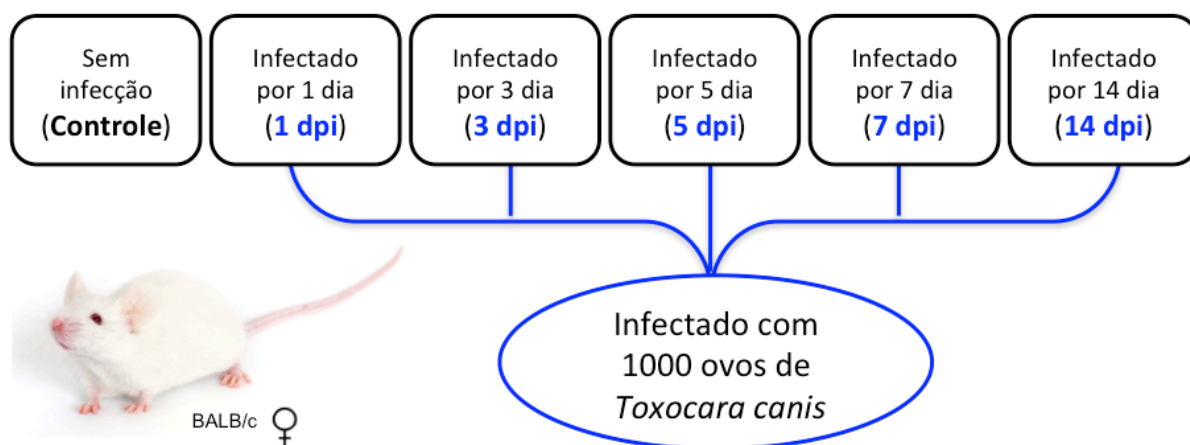
Antes da inoculação, os ovos embrionados foram lavados 3 vezes com água filtrada com centrifugação a 600 g por 10 minutos. Os camundongos foram inoculados via sonda gástrica com 100  $\mu$ L da suspensão de ovos contendo 1000 ovos embrionados e depois com 100  $\mu$ L de água filtrada para remover os ovos remanescentes para fora da seringa e agulha de gavage.

#### IV.4. Grupos Experimentais

Para responder a PARTE 1 deste estudo, na **determinação do protocolo de infecção por *T. canis*** em camundongos BALB/c adultos, foram utilizados 50 animais (Ilustração 8) divididos para eutanásia em:

- **Controle:** Composto por 6 animais que não foram infectados por *T. canis*.
- **1 dia pós-infecção (dpi):** Composto por 6 animais 1 dia infectados por *T. canis*.
- **3 dpi:** Composto por 6 animais 3 dias infectados por *T. canis*.
- **5 dpi:** Composto por 6 animais 5 dias infectados por *T. canis*.

- **7 dpi:** Composto por 13 animais infectados por *T. canis*, sendo 7 animais para a análise histológica e 6 animais para as demais análises.
- **14 dpi:** Composto por 13 animais infectados por *T. canis*, sendo 7 animais para a análise histológica e 6 animais para as demais análises.



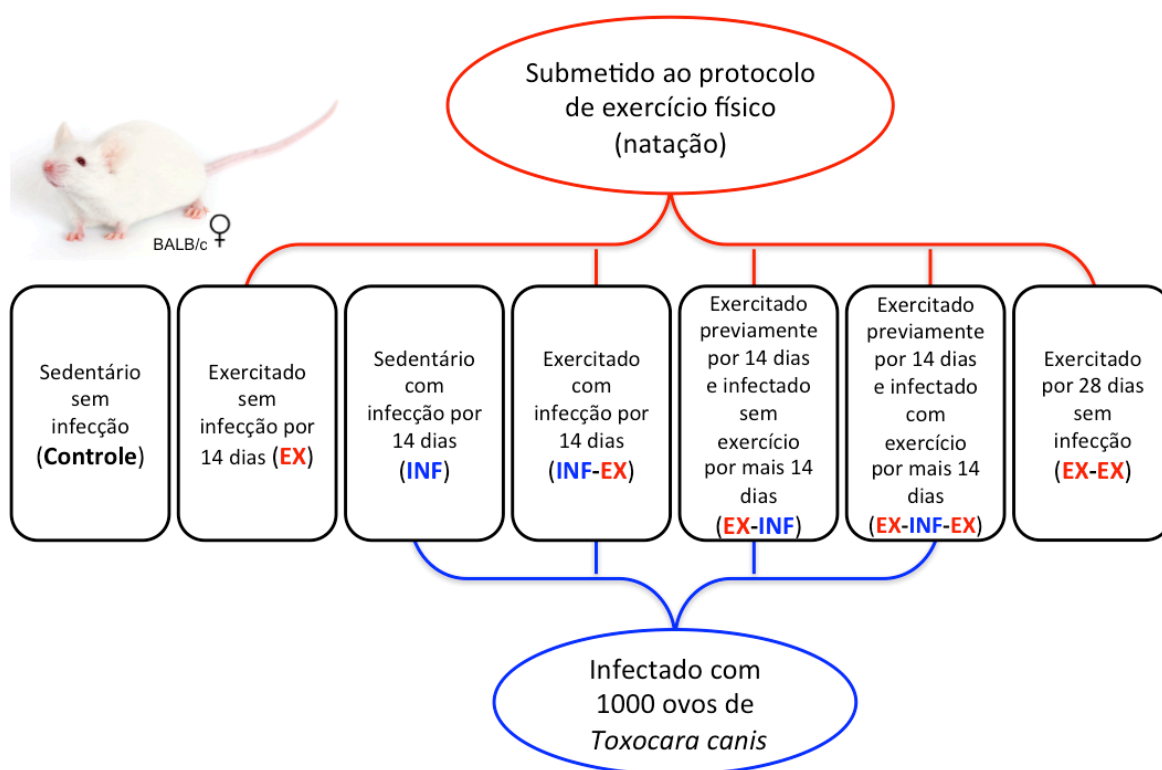
**Ilustração 8.** Divisão dos grupos experimentais da PARTE 1.

Para responder a PARTE 2 deste estudo, na **verificação do binômio exercício físico e infecção por *T. canis***, foram utilizados 154 camundongos BALB/c adultos divididos aleatoriamente em grupos experimentais com até 29 animais/grupo para eutanásia em 7 e 14 dias pós-infecção. Conforme representado na ilustração 9, os grupos foram:

- **Sedentário sem infecção** (Controle, n=14): Composto por camundongos que não foram infectados por *T. canis* e não foram submetidos ao programa de treinamento físico.
- **Exercitado sem infecção** (EX, n=16): Composto por camundongos que não foram infectados por *T. canis*, mas foram submetidos ao programa de treinamento físico por 14 dias.
- **Sedentário com infecção** (INF, n=26): Composto por camundongos que foram infectados por *T. canis* por 14 dias e não foram submetidos ao programa de treinamento físico.
- **Exercitado com infecção** (INF-EX, n=24): Composto por camundongos que foram infectados por *T. canis* e submetidos ao programa de treinamento físico por 14 dias.

Para verificar o efeito do exercício físico na prevenção da infecção por *T. canis*, mais três grupos foram compostos:

- **Exercitado previamente e infectado sem exercício** (EX-INF, n=26): Composto por camundongos que foram submetidos ao programa de treinamento físico por 14 dias antes da infecção por *T. canis*, porém após a infecção não continuaram o programa de treinamento físico.
- **Exercitado previamente e infectado com exercício** (EX-INF-EX, n=28): Composto por camundongos que foram submetidos ao programa de treinamento físico por 14 dias antes da infecção por *T. canis*, e continuaram o programa de treinamento físico durante o período de infecção de 14 dias.
- **Exercitado previamente e exercitado sem infecção** (EX-EX, n=20): Composto por camundongos que não foram infectados por *T. canis*, mas foram submetidos ao programa de treinamento físico por 28 dias.

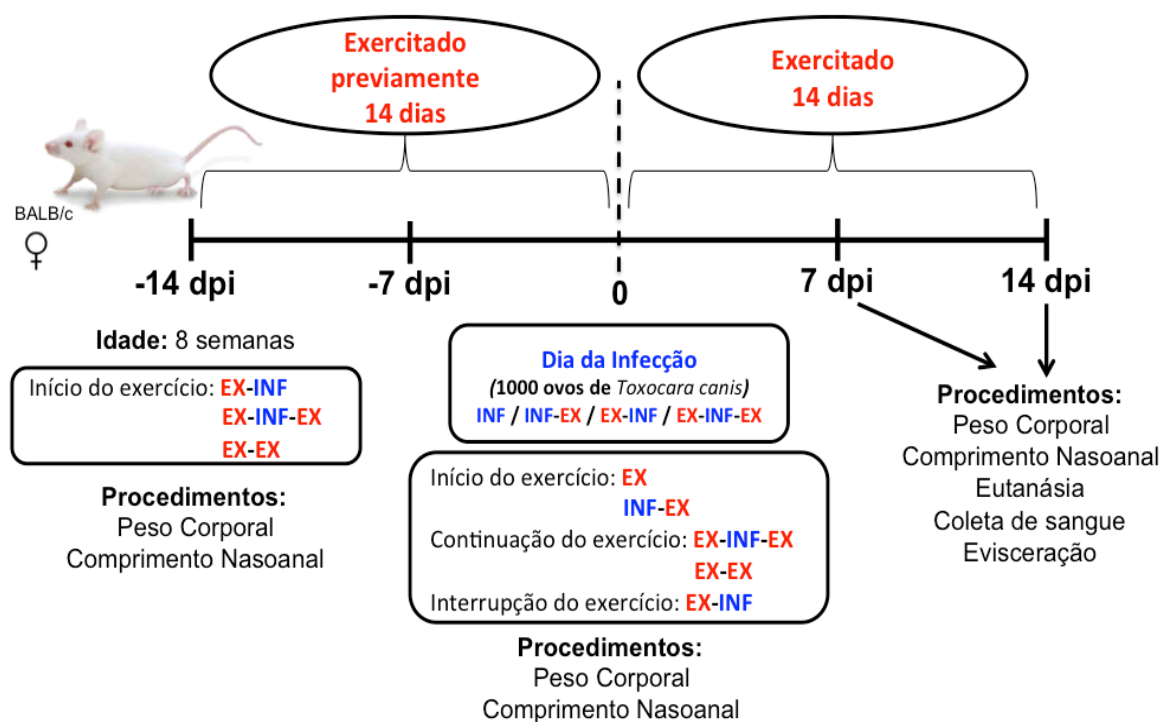


**Ilustração 9.** Divisão dos grupos experimentais da PARTE 2.

Todos os camundongos da PARTE 2 tiveram seu comprimento nasoanal mensurado com paquímetro e massa corporal medida em balança semi-analítica (Shimadzu®), antes e após serem submetidos ao protocolo de exercício físico ou não e infectados ou não por *T. canis*, a fim de verificar seu desenvolvimento corporal.

Todos os animais foram mortos por dose letal de anestésico (cetamina 225 mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg) via intraperitoneal.

O sangue foi coletado e o cérebro, fígado e pulmões foram retirados para recuperação das larvas, determinação do perfil de citocinas tecidual e quantificação da atividade enzimática da peroxidase de eosinófilos (EPO) e mieloperoxidase (MPO), e análise histopatológica, conforme demonstrado na ilustração 10.

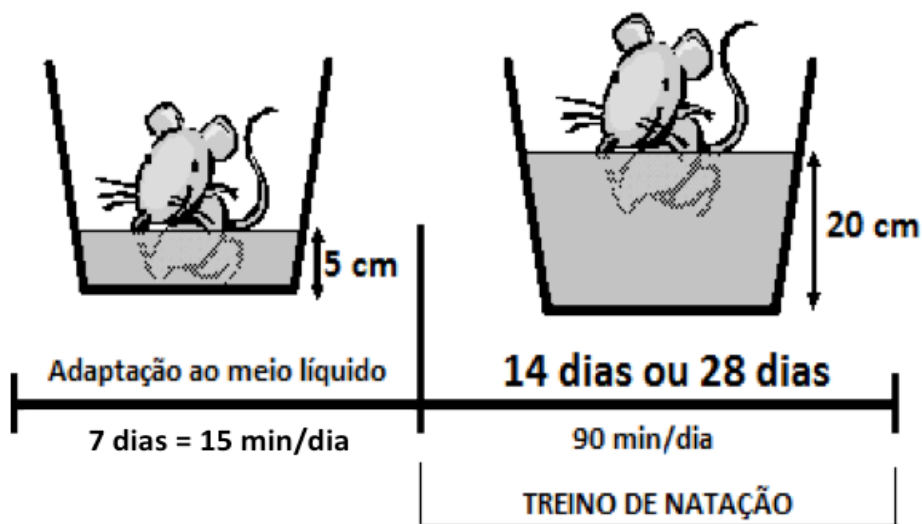


**Ilustração 10.** Delineamento da evolução temporal do experimento da PARTE 2.

#### IV.5. Protocolo de Treinamento Físico

O exercício físico foi a natação, no qual os grupos submetidos ao programa de treinamento físico foram colocados 7 dias antes ao início do treino, em um tanque de polietileno retangular (36 cm de altura x 40 cm de largura x 55 cm de profundidade) contendo um nível máximo de 5 cm de água aquecida à temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , por um período de 15 minutos. Este procedimento permite a adaptação dos animais ao meio líquido, a qual foi confirmada pela diminuição da defecação, sem proporcionar condicionamento físico.

No treinamento físico, os animais foram colocados no mesmo tanque da adaptação ao meio líquido contendo 20 cm de água à temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , sem sobrecarga adicional ao corpo. Esse nível de água é suficiente para que os animais sejam estimulados a nadar. O treinamento de natação foi praticado diariamente sempre pela manhã (período escuro para os camundongos) sendo 1 sessão/dia com duração de 90 minutos por 14 dias ou 28 dias. Essa duração do treino caracteriza a intensidade moderada de exercício físico para camundongos, de acordo com Evangelista et al. (2003). Nos grupos com treinamento prévio, o treinamento foi por 14 dias antes da infecção. A ilustração 11 mostra o protocolo de exercício físico.



**Ilustração 11.** Sequência experimental do protocolo de exercício físico (natação).  
Adaptado de Volpato et al. (2009).

No último dia do treinamento, o lactato plasmático foi dosado imediatamente após a sessão de treinamento para determinar a intensidade de esforço físico realizado. O lactato foi determinado como biomarcador de intensidade de esforço físico devido o glicogênio

intramuscular ser a fonte primária de energia para a glicólise anaeróbia durante a realização do exercício físico. Assim, quanto maior é a intensidade do esforço físico proposto, maior será a atividade da glicólise anaeróbia, a qual produz lactato no músculo esquelético e induz o acúmulo de lactato no sangue (Ferreira et al., 2007b). A concentração de lactato no sangue foi medida pelo lactímetro portátil (Accusport<sup>®</sup>, Roche) através de gotas de sangue (25 µL) retirada da cauda de cada animal.

#### **IV.6. Análise do Sangue Periférico**

O sangue foi coletado pelo plexo ocular com uma pipeta de vidro Pasteur de 150 mm e dividido em sangue total com EDTA para análise hematológica; e o restante do sangue permaneceu à temperatura ambiente até a coagulação para obtenção do soro por centrifugação a 1000 g por 20 minutos a 4°C. O soro obtido foi imediatamente estocado no freezer -80°C.

##### **IV.6.1. Perfil Hematológico**

Com o sangue total coletado foi realizado o hemograma pelo método automático no Contador Hematológico Veterinário Bio 2900 Vet (Bioeasy<sup>®</sup>) e a diferenciação entre os leucócitos foi analisada por esfregaço sanguíneo feito com uma pequena gota (5 µL) de sangue posta em forma de uma película sobre uma lâmina de vidro para microscopia corada com Panótico Rápido (Laborclin<sup>®</sup>), pela imersão do esfregaço por 5 segundos em cada solução, sendo uma solução fixadora (solução de triarilmetano a 0,1%) e duas soluções corantes (solução de xantenos a 0,1% e solução de tiazinas a 0,1%), e analisado em microscópio óptico DM500 (Leica Microsystems<sup>®</sup>) com aumento de 1000x em óleo de imersão.

##### **IV.6.2. Perfil de Citocinas Sistêmicas**

A partir de alíquotas de soro sanguíneo foi dosado o perfil de citocinas IL-4 (CN: DY404, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-5 (CN: DY405, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-6 (CN: DY406, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-10 (CN: DY417, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-13 (CN: DY413, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-17 (CN: DY421, R&D Systems<sup>®</sup>), IL-33 (CN: DY3626, R&D Systems<sup>®</sup>), IFN- $\gamma$  (CN: DY485, R&D Systems<sup>®</sup>) e TNF- $\alpha$  (CN: DY410, R&D Systems<sup>®</sup>) pelo teste imunoenzimático de

ELISA de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante, com modificações referentes ao volume.

Resumidamente, este teste consistiu da sensibilização das microplacas *half area* de 96 poços (Corning®) com 25 µL/poço do anticorpo de captura (anticitocina de interesse), diluído em PBS estéril, por 12 horas a 4°C. Após a sensibilização lavou-se por três vezes a microplaca na lavadora de ELISA AquaMax 2000 (Molecular Devices®) com solução de PBS com 0,5% de Tween 20. Foi realizada a etapa de bloqueio com 100 µL/poço com solução de PBS contendo 3% de albumina do soro bovino (BSA) por 1 hora em temperatura ambiente, e lavou-se novamente por três vezes a microplaca, conforme descrito acima. As amostras de soro sanguíneo foram adicionadas (25 µL/poço) nos seus poços definidos, assim como o padrão da citocina em diluição seriada, por 2 horas a 4°C. Após nova etapa de lavagem, adicionou-se 25 µL/poço do anticorpo de detecção diluído em PBS contendo 0,1% de BSA por 2 horas em temperatura ambiente, e lavou-se novamente a microplaca. Após isto, foi adicionado 25 µL/poço da solução de PBS contendo 0,1% de BSA e 0,5% de estreptavidina por 30 minutos em temperatura ambiente, e lavou-se novamente a microplaca. Foi adicionado 25 µL/poço de solução tampão de citrato contendo 6,6 mM do substrato peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 1,5 mM de O-fenilenodiamina dihidrocloridrato (OPD), pH 5, e a reação enzimática foi interrompida após 30 minutos com solução de ácido sulfúrico 4 N. A absorbância foi determinada no leitor de ELISA VERSAmax (Molecular Devices®) em comprimento de onda de 490 nm. A concentração de citocinas foi calculada a partir da interpolação realizada de acordo com a curva padrão.

#### **IV.7. Quantificação das larvas de *Toxocara canis***

A quantificação das larvas nos animais infectados foi realizada pela recuperação das larvas de *T. canis* nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral conforme descrito por Boes et al. (1998).

Os tecidos coletados foram triturados em placa de Petri e colocados no aparelho de Baermann adaptado durante 4 horas em 37°C com PBS (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013). Após a incubação, o sedimento foi coletado e centrifugado a 600 g por 10 minutos à 20°C, e as larvas foram fixadas em formalina 10% e contadas em microscópio óptico DM500 (Leica Microsystems®) com aumento de 100x.

#### **IV.8. Análise dos Tecidos**

As amostras dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral coletados foram triturados pelo homogeneizador de tecidos Power Gen 125 (Fisher Scientific®) em solução de PBS com 0,05% de Tween 20 suplementada com inibidores de protease (0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 mM de cloreto de benzetônio, 10 mM de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e 2 UI de aprotinina A), na proporção de 100 mg de tecido por 1 mL de solução.

O homogenado de cada tecido foi centrifugado à 10.000 rotações por minutos (rpm) durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para determinação das citocinas teciduais. O sedimento foi utilizado para quantificação da atividade enzimática da peroxidase de eosinófilos (EPO) e mieloperoxidase (MPO).

##### **IV.8.1. Perfil de Citocinas nos Tecidos**

A quantificação das citocinas IL-4 (CN: DY404, R&D Systems®), IL-5 (CN: DY405, R&D Systems®), IL-6 (CN: DY406, R&D Systems®), IL-10 (CN: DY417, R&D Systems®), IL-13 (CN: DY413, R&D Systems®), IL-17 (CN: DY421, R&D Systems®), IL-33 (CN: DY3626, R&D Systems®), IFN- $\gamma$  (CN: DY485, R&D Systems®) e TNF- $\alpha$  (CN: DY410, R&D Systems®) dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral foi obtida pelo teste imunoenzimático de ELISA de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante e descrito acima na determinação do perfil de citocinas sérica, com a modificação que as amostras foram diluída 1:3 em solução de PBS contendo 0,1% de BSA.

##### **IV.8.2. Atividade Enzimática nos Tecidos**

A infiltração de eosinófilos e neutrófilos nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral foi indiretamente estimada por meio da atividade enzimática destas células.

Para eosinófilos, foi quantificado o nível de peroxidase de eosinófilos (EPO) nos tecidos dos animais infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico, conforme padronizado por Silveira et al. (2002). Resumidamente, no sedimento dos tecidos, as hemácias presentes foram lisadas pela adição de solução hipotônica (1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,2%) e após 30 segundos, a osmolaridade foi reestabelecida pela adição de igual volume (1 mL) de solução de cloreto de sódio a 1,6%



contendo 5% de glicose. Após centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante, o tecido foi ressuspensionado em PBS com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), pH 7,4, para lise das membranas celulares. O material foi homogeneizado e submetido a congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes, com o objetivo de romper as vesículas que contêm as peroxidases. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático feito em microplacas de 96 poços de fundo chato (Sarstedt®). Este ensaio consistiu da adição de 75 µL de cada amostra à 75 µL de solução tampão de tris-salino (TBS) contendo 6,6mM do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 1,5mM de OPD, pH 8. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de solução de ácido sulfúrico 1 M, sendo a absorbância determinada no leitor de ELISA VERSAmax (Molecular Devices®) em comprimento de onda de 492nm.

Para neutrófilos, foi quantificado o nível de enzima mieloperoxidase (MPO) nos tecidos dos animais infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico, conforme descrito por Barcelos et al. (2005). Sucintamente, no sedimento dos tecidos, as hemácias presentes foram lisadas, a osmolaridade restabelecida igual ao protocolo para EPO. Após centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante, o tecido foi ressuspensionado em PBS com 15mM de EDTA, pH 4,7, e após nova centrifugação (10.000 rpm por 10 minutos a 4°C) e descarte do sobrenadante o tecido foi ressuspensionado em PBS com 0,5% de HTAB, pH 5,4, para lise das membranas celulares. O material foi homogeneizado e submetido a congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes para lise de vesículas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático feito em microplacas de 96 poços de fundo chato (Sarstedt®). Este ensaio consistiu da adição de 25 µL de cada amostra à 25 µL da solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 3,845 mg/mL, e incubação em estufa climatizada (37°C) por 5 minutos. Após incubação foi adicionado o 100 µL de PBS com 0,5% de HTAB, pH 5,4, contendo 0,002% do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e uma nova incubação em estufa climatizada por 5 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de ácido sulfúrico 1 M, sendo a absorbância também determinada no leitor de ELISA VERSAmax (Molecular Devices®), só que como comprimento de onda de 450 nm.

As duas peroxidases (EPO e MPO) foram diferenciadas pelos valores de pH das soluções utilizadas, visto que cada enzima possui seu pH específico de ação. O estudo de Collins et al. (1995) demonstrou que a reatividade cruzada de EPO/MPO nesta análise é menor que 1%.

#### IV.8.3. Histopatologia

As amostras dos tecidos hepático, pulmonar e cerebral coletados foram fixados em solução de formalina 10%. Os tecidos foram desidratados gradualmente em etanol (70%, 90%, 100%) depois diafanizados no xilol e incluídos em parafina. O bloco de parafina foi cortado em 4-5 microns de espessura e fixado na lâmina de microscopia e coradas com hematoxilina e eosina para avaliação dos danos tecidual.

Para avaliar a intensidade das lesões hepáticas, pulmonares e encefálicas foram calculadas as áreas de hemorragia, inflamação e espessamento do septo visualizadas com aumento de 100x, 200x e 400x respectivamente, no microscópio Axiolab (Carl Zeiss®), digitalizadas através da microcâmera TK-1270/RGB (JVC) e mensuradas utilizando o software KS400 (Carl Zeiss®).

Para calcular a área analisada dos tecidos hepático e cerebral, todas as lâminas foram digitalizadas no escaneador CanoScan LiDE 110 (Canon®) com resolução de 300 dpi, os pixels de cada imagem foram selecionados para a criação de uma imagem binária e cálculo da área total do corte. A área do menor corte foi usada como um padrão mínimo do tecido para análise estatística (Costa et al., 2007; Caliari et al., 1995).

Para calcular a área analisada do tecido pulmonar, todas as lâminas tiveram 30 imagens aleatórias digitalizadas com aumento de 200x, perfazendo a área total por lâmina de  $13,25 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  de parênquima pulmonar analisado em cada animal.

#### IV.9. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando software Prism 6.0 (GraphPad Inc, EUA). Os testes de normalidade D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk foram utilizados para identificar a distribuição dos dados paramétricos. Para a análise dos grupos experimentais com dados paramétricos foi utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, e a análise dos grupos experimentais com dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. Para a análise histopatológica da PARTE 1 foi utilizado o teste t não pareado. O teste de Grubbs foi utilizado para detectar possíveis valores considerados *outlier*. A diferença estatística foi considerada significativa quando o  $p < 0,05$ .

## **V. RESULTADOS**

## **PARTE 1**

**Determinação do protocolo de infecção por *Toxocara canis*  
em camundongos BALB/c adultos.**

### V.1. Análise dos ovos nas culturas do parasito *Toxocara canis*

As culturas dos ovos de *T. canis* foram feitas com 33 fêmeas do parasito e foram observadas a cada 2 semanas para determinação da taxa de embrionamento. Com 2 semanas, dos 685.000 ovos presentes nas culturas, 295.000 ovos (43%) estavam embrionados. Com 4 semanas de cultura, a taxa de embrionamento foi 51% e com 6 semanas foi para 53%, não apresentando variação a partir desse período (Gráfico 1).

A inoculação com 1000 ovos embrionados por animal em todos os grupos experimentais infectados por *T. canis* foi realizada após 6 semanas de cultura.

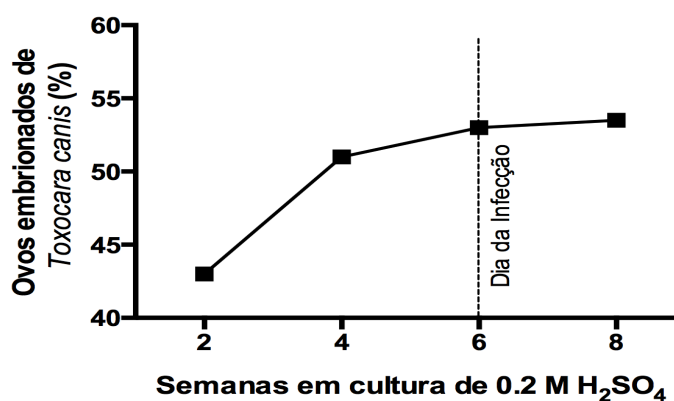
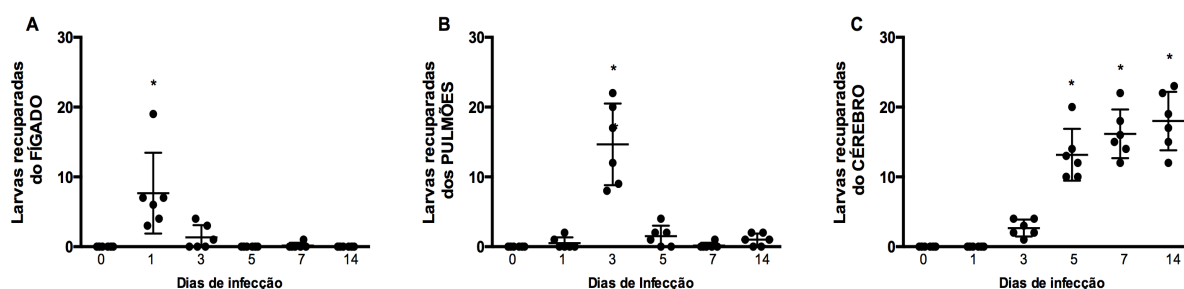


Gráfico 1. Taxa de embrionamento de 685 mil ovos de *Toxocara canis*.

## V.2. Análise parasitológica da recuperação das larvas de *Toxocara canis* nos tecidos de camundongos BALB/c

Para determinar a presença de larvas de *T. canis* nos tecidos de camundongos BALB/c adultos infectados, foram recuperadas larvas dos tecidos hepáticos, pulmonar e cerebral nos tempos 1, 3, 5, 7 e 14 dias pós-infecção (dpi).

Os resultados mostraram que com 1 dpi, as larvas estavam no fígado (Gráfico 2A), enquanto que com 3 dpi, as larvas haviam migrado para os pulmões (Gráfico 2B). A partir do 5 dpi até o 14 dpi, as larvas estavam predominantemente no cérebro (Gráfico 2C), mostrando assim o desenvolvimento da neurotoxocarose.



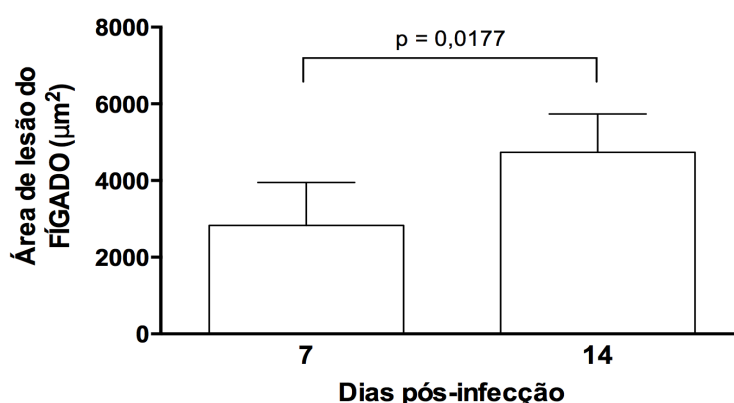
**Gráfico 2. Recuperação das larvas de *Toxocara canis* em diferentes tecidos de camundongos BALB/c ao longo do tempo.** (A) Larvas recuperadas do tecido pulmonar. (B) Larvas recuperadas do tecido hepático. (C) Larvas recuperadas do tecido cerebral. n = 6 animais por tempo de infecção. Dados representados em média ± desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*p<0,05.

### V.3. Análise histopatologia em camundongos BALB/c infectado por *Toxocara canis*

Para avaliar os danos teciduais causados pela migração das larvas de *T. canis*, os tecidos hepático, pulmonar e cerebral foram analisados morfológicamente, de forma quantitativa e qualitativa, nos tempos 7 dpi e 14 dpi.

#### V.3.1. Análise da área de infiltrado inflamatório no tecido hepático em camundongos infectado por *Toxocara canis*

Na histopatologia do fígado, a área avaliada em cada corte histológico foi de  $15 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . Os dados mostraram lesão tecidual ocasionado por infiltrado inflamatório com predominância de leucócitos polimorfonucleares e sem a presença de larvas. A área de lesão com 14 dpi foi maior que com 7 dpi (Gráfico 3).

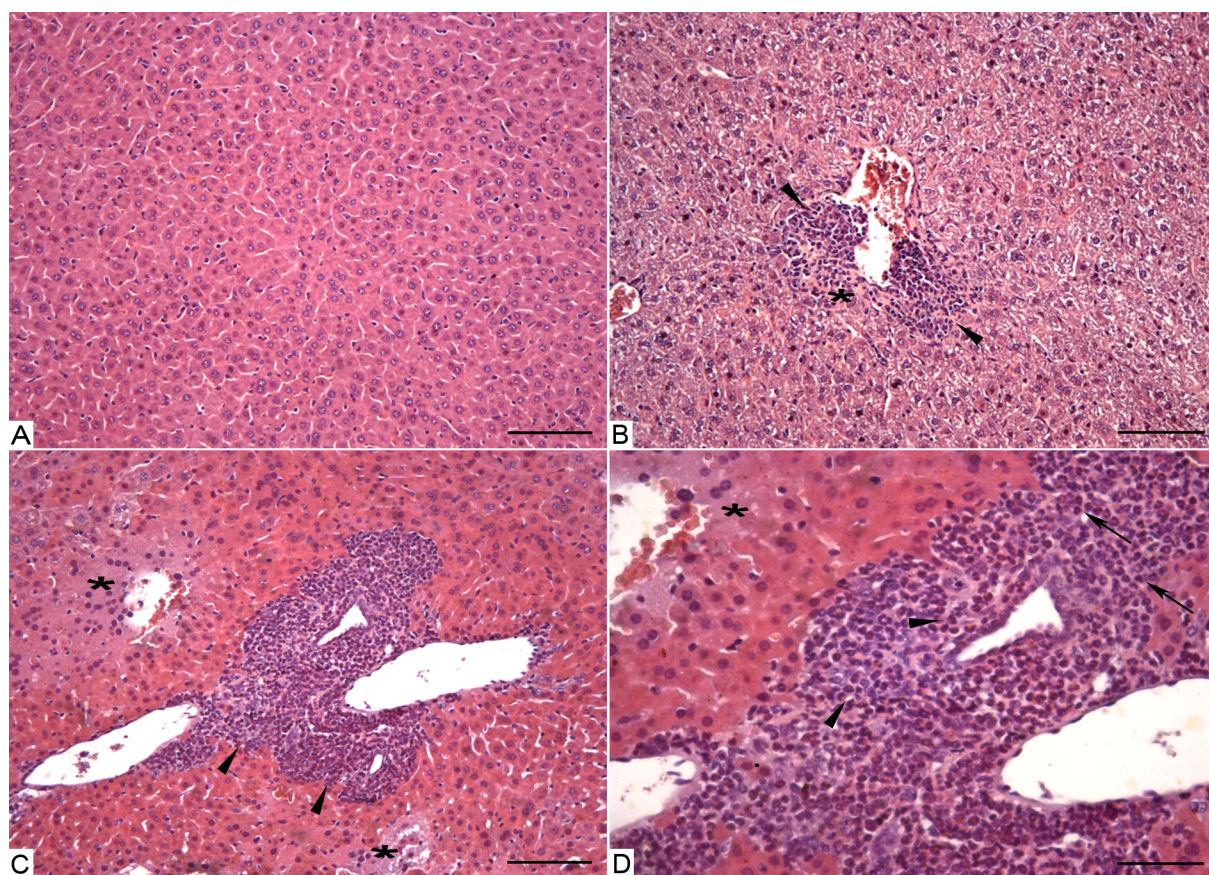


**Gráfico 3.** Área de lesão do fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*. n = 7 animais por tempo de infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste t não pareado com valor de p representado no gráfico.

A avaliação histopatológica do fígado do grupo não infectado (0 dpi) mostrou aspecto histológico normal, com o parênquima hepático constituído pela veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos e por capilares sinusoides; e os hepatócitos estavam com formato poligonal e núcleo esférico centralizado (Figura 1A).

O fígado dos animais com 7 dpi apresentou regiões com moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal constituído principalmente por eosinófilos e neutrófilos, e pequenas regiões com necrose dos hepatócitos. Também foi observado moderado infiltrado inflamatório perivascular (Figura 1B).

O fígado dos animais com 14 dpi mostrou regiões com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear constituído por eosinófilos e neutrófilos, e áreas com necrose hepática moderada associada ao infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Também foi observada a presença intensa de infiltrado inflamatório perivascular no parênquima hepático destes animais (Figura 1C e 1D).

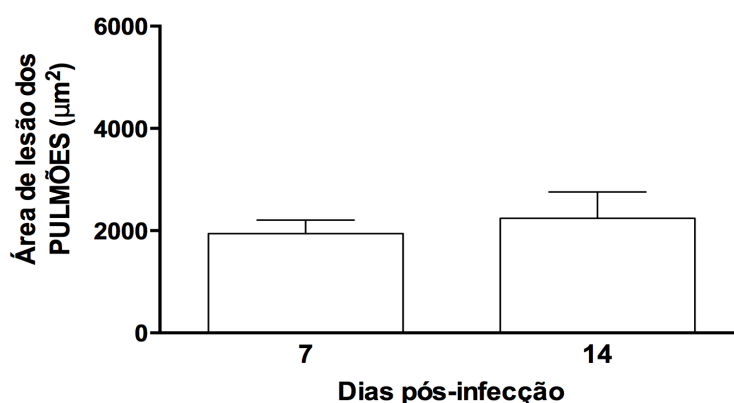


**Figura 1. Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*.** (A) Grupo não infectado com parênquima hepático normal. H&E. Barra: 100  $\mu$ m. (B) Grupo 7 dias pós-infecção (dpi): presença de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e necrose hepática (\*). H&E. Barra: 100  $\mu$ m. (C) Grupo 14 dpi: presença de extenso infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e necrose hepática (\*). H&E. Barra: 100  $\mu$ m. (D) Figura anterior com aumento mostrando infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos (cabeça das setas) e neutrófilos (setas), bem como a presença de necrose (\*). H&E. Barra: 50 $\mu$ m.



### V.3.2. Análise do espessamento do septo no tecido pulmonar em camundongos infectado por *Toxocara canis*

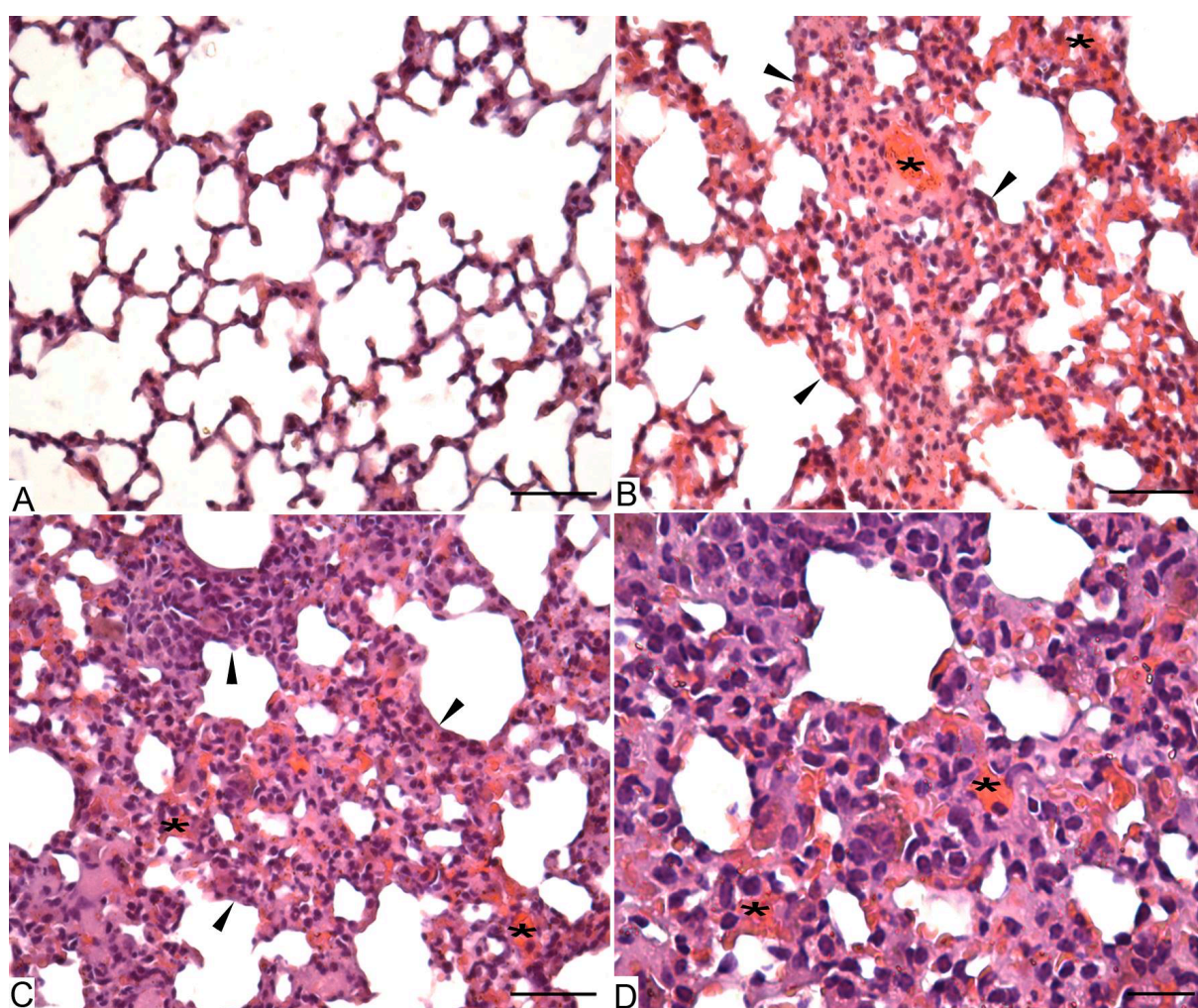
Na histopatologia dos pulmões, a área avaliada em cada corte histológico foi de  $15,25 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . Os dados mostraram lesão tecidual ocasionado por espessamento do septo devido ao infiltrado inflamatório e hemorragia. A área de lesão não apresentou diferença de 7 dpi para 14 dpi (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Área de lesão dos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*. n = 7 animais por tempo de infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste t não pareado ( $p < 0,05$ ).

A avaliação histopatológica dos pulmões do grupo não infectado (0 dpi) mostrou aspecto histológico normal, com alvéolos aerados e septos interlobulares e alveolares de espessura normal (Figura 2A).

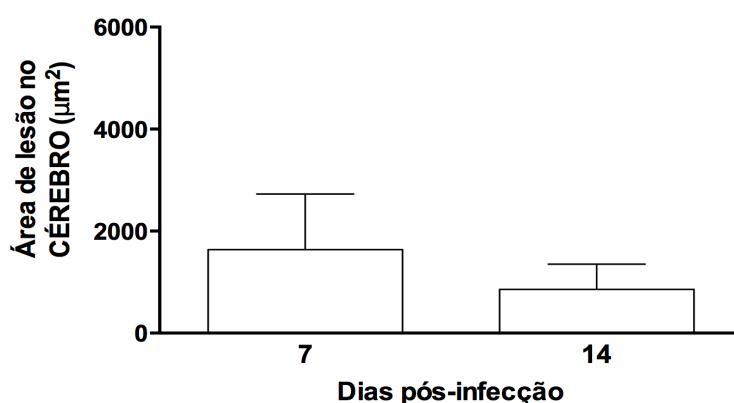
Os pulmões dos animais com 7 e 14 dpi apresentaram lesões no parênquima pulmonar caracterizadas por grande espessamento dos septos interalveolares pela presença de intenso infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, e de zonas hemorrágicas. O infiltrado inflamatório também foi encontrado preenchendo os lúmens alveolares e junto aos bronquíolos e vasos sanguíneos, com o mesmo perfil celular do infiltrado presente nos septos interalveolares (Figura 2B, 2C e 2D).



**Figura 2. Fotomicrografia do espessamento do septo nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*.** (A) Grupo não infectado com parênquima pulmonar normal. H&E. Barra: 50  $\mu$ m. (B) Grupo 7 dias pós-infecção (dpi): intenso espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50  $\mu$ m; (C) Grupo 14 dpi: intenso espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). (D) Figura anterior com aumento mostrando infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, bem como a presença de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 20  $\mu$ m.

### V.3.3. Análise da área de hemorragia no tecido cerebral em camundongos infectado por *Toxocara canis*

Na histopatologia do cérebro, a área avaliada em cada corte histológico foi de  $15 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ . Os dados mostraram lesão tecidual ocasionado por áreas hemorrágicas e a presença de larvas. A área de lesão não apresentou diferença de 7 dpi para 14 dpi (Gráfico 5).

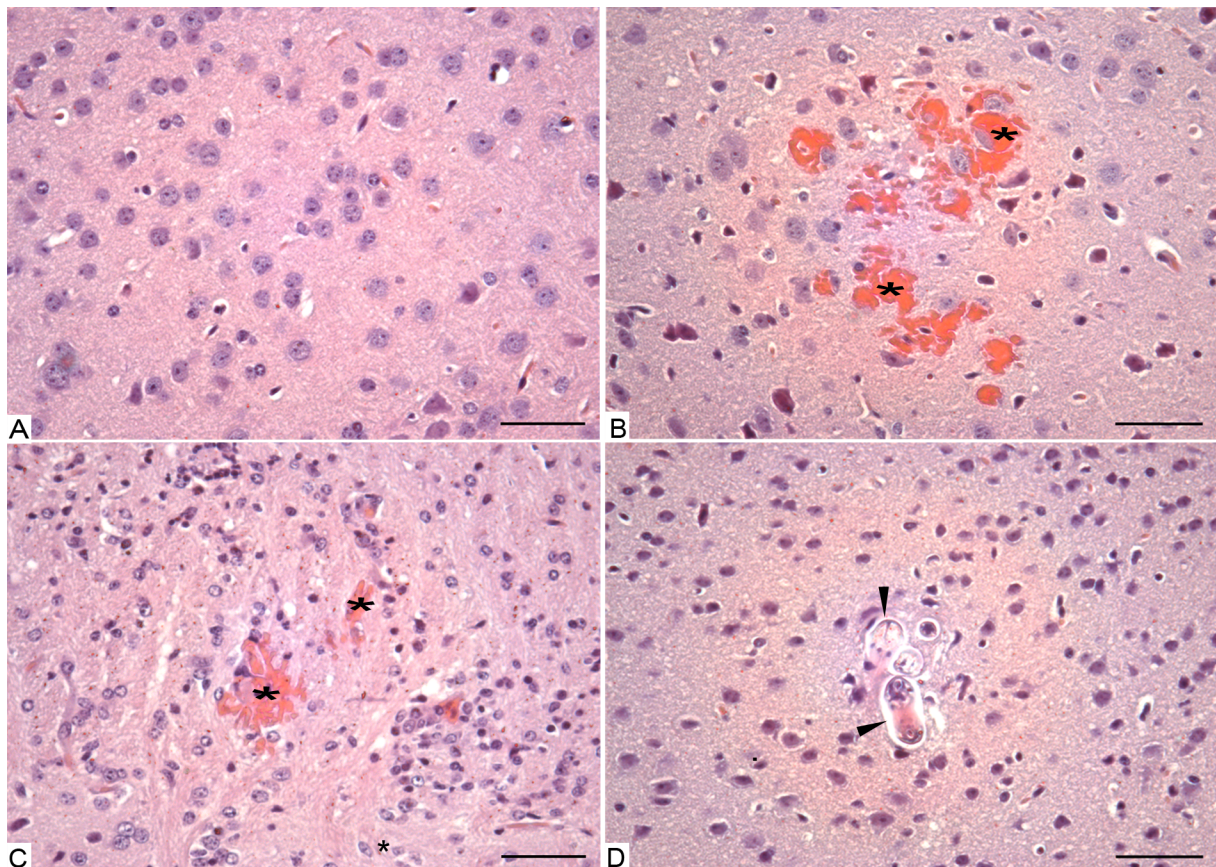


**Gráfico 5.** Área de lesão do cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*. n = 7 animais por tempo de infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste t não pareado ( $p < 0,05$ ).



A avaliação histopatológica do cérebro do grupo não infectado (0 dpi) mostrou aspecto histológico normal (Figura 3A).

O cérebro dos animais com 7 e 14 dpi apresentou lesões parenquimatosas caracterizadas por cavidades hemorrágicas (Figura 3B e 3C) e larvas espalhadas foram visualizados no cérebro e tronco cerebral (Figura 3D).



**Figura 3. Fotomicrografia da área hemorrágica e de larvas no cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*.** (A) Grupo não infectado com parênquima cerebral normal. H&E. Barra = 50  $\mu$ m. (B) Grupo 7 dias pós-infecção (dpi): presença de áreas hemorrágicas (\*). H&E. Barra = 50  $\mu$ m. (C) Grupo 14 dpi: presença de áreas hemorrágicas (\*). H&E. Barra = 50  $\mu$ m. (D) Grupo 14 dpi: presença de larva (cabeça da seta). H&E. Barra = 50  $\mu$ m.

#### V.4. Análise do sangue periférico de camundongos infectados por *Toxocara canis*

##### V.4.1. Caracterização do perfil leucocitário, eritrocitário e plaquetário de camundongos infectados por *Toxocara canis*

Para avaliar o perfil leucocitário, eritrocitário e plaquetário frente a infecção por *T. canis* foram quantificados e diferenciados os glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas nos tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dpi (Tabela 1).

Os resultados mostraram que com a progressão da infecção, os leucócitos totais aumentaram, sendo os grupos 7 dpi e 14 dpi apresentaram maiores valores que os demais grupos. Os animais com 7 dpi apresentaram neutrofilia. A eosinofilia foi evidente a partir do 7 dpi, persistindo até o 14 dpi. Os monócitos não mostraram diferenças entre grupos. O perfil eritrocitário mostrou diminuição do total de eritrócitos e da concentração de hemoglobina nos animais com 5 dpi quando comparado com os demais grupos. As plaquetas não mostraram diferenças entre grupos.

**Tabela 1. Perfil leucocitário, eritrocitário e plaquetário de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*.**

|   | Dias pós-infecção       |                         |                         |                         |   |  |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|--|
|   | 0                       | 1                       | 3                       | 5                       | 7   | 14   |
| <b>Leucócitos Totais</b><br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) | 4,6 ± 1,4               | 2,6 ± 0,3               | 4,0 ± 0,4               | 5,2 ± 1,5               | 6,8 ± 2,1 <sup>b,c</sup>                  | 6,3 ± 1,5 <sup>b,c</sup>                     |
| Linfócito<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)                | 3,45 ± 1,11<br>(77-87%) | 1,40 ± 0,15<br>(47-61%) | 2,50 ± 0,18<br>(58-68%) | 3,11 ± 0,88<br>(57-63%) | 3,93 ± 1,23<br>(51-67%)                   | 3,54 ± 1,18<br>(47-63%)                      |
| Monócito<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)                 | 0,01 ± 0,01<br>(0-1%)   | 0,03 ± 0,03<br>(0-3%)   | 0,02 ± 0,02<br>(0-1%)   | 0,01 ± 0,02<br>(0-2%)   | 0,07 ± 0,06<br>(0-2%)                     | 0,03 ± 0,04<br>(0-2%)                        |
| Neutrófilo<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)               | 1,10 ± 0,42<br>(11-23%) | 1,15 ± 0,31<br>(35-51%) | 1,41 ± 0,34<br>(30-40%) | 1,86 ± 0,66<br>(32-38%) | 2,25 ± 1,12 <sup>b,c,f</sup><br>(23-41%)  | 1,00 ± 0,32<br>(13-23%)                      |
| Eosinófilo<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)               | 0,03 ± 0,02<br>(0-2%)   | 0,06 ± 0,03<br>(1-5%)   | 0,07 ± 0,03<br>(1-3%)   | 0,21 ± 0,07<br>(3-5%)   | 0,48 ± 0,18 <sup>a,b,c,f</sup><br>(5-13%) | 1,68 ± 0,48 <sup>a,b,c,d,e</sup><br>(21-33%) |
| <b>Eritrócito</b><br>(x 10 <sup>6</sup> /μL)        | 7,0 ± 2,0               | 9,3 ± 0,7               | 9,2 ± 1,0               | 5,8 ± 1,0*              | 8,1 ± 1,3                                 | 8,0 ± 0,7                                    |
| Hemoglobina<br>(g/dL)                               | 16,7 ± 1,2              | 17,0 ± 1,4              | 17,6 ± 1,6              | 13,3 ± 1,3*             | 15,8 ± 1,4                                | 17,0 ± 1,3                                   |
| <b>Plaqueta</b><br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)          | 722 ± 35                | 725 ± 58                | 598 ± 29                | 766 ± 57                | 758 ± 31                                  | 725 ± 47                                     |

n = 6 animais por tempo de infecção. Dados representados em média ± desvio padrão e valores relativos dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*Grupo diferente (p<0,05) de todos os outros grupos. Diferença estatística (p<0,05) para os tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dpi estão representados por a, b, c, d, e e f, respectivamente.

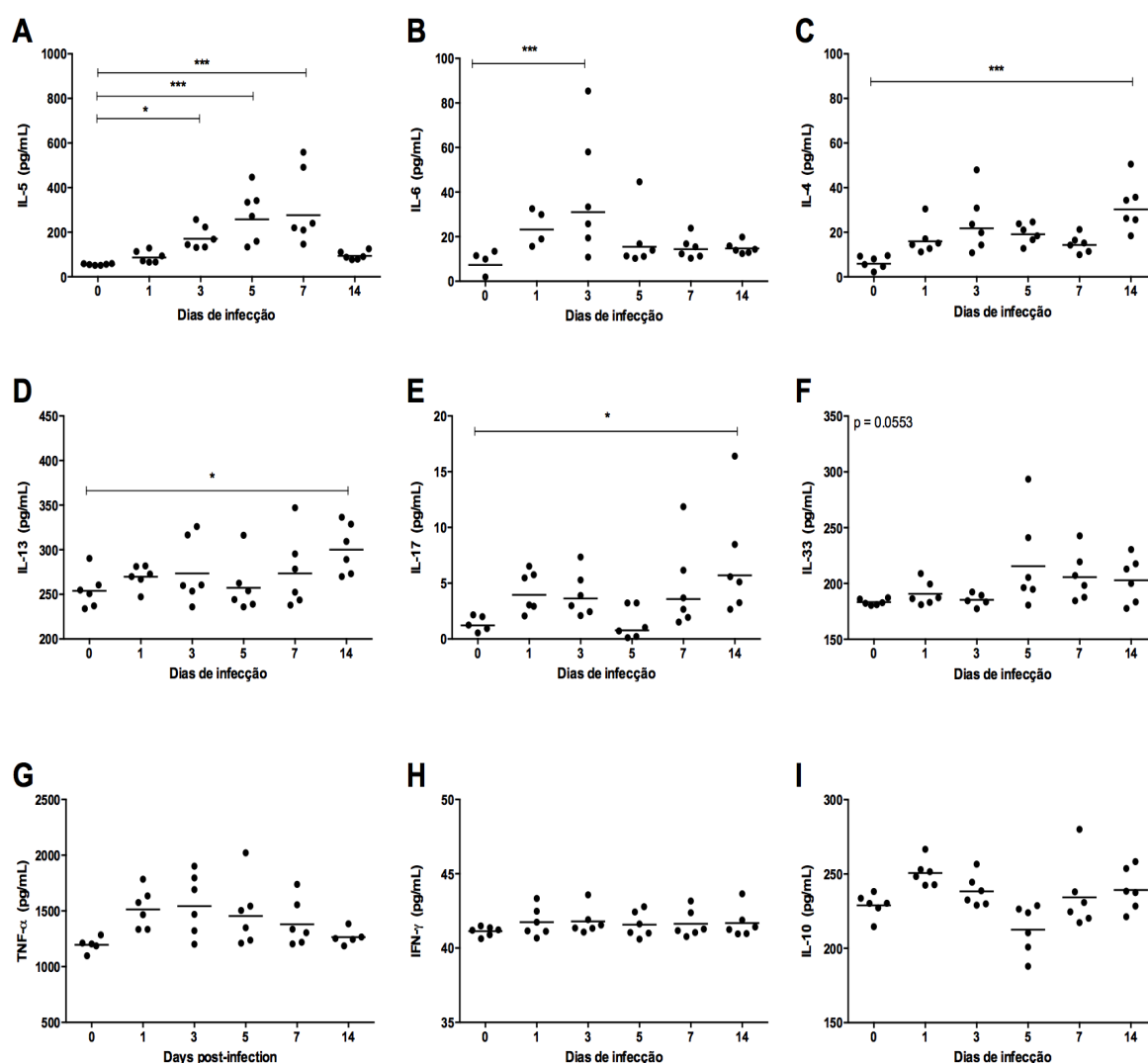
## V.5. Análise da resposta inflamatória de camundongos infectados por *Toxocara canis*

### V.5.1. Caracterização do perfil de citocinas plasmáticas de camundongos infectados por *Toxocara canis*

Para caracterizar a resposta imune sistêmica durante a infecção por *T. canis*, foram analisados os níveis plasmáticos de citocinas T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 e reguladoras nos tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 14 dpi.

Notavelmente, a infecção por *T. canis* induziu uma mistura de resposta inflamatória inata/T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>2, com a predominância deste último. A resposta T<sub>H</sub>2 foi evidenciada pelo aumento de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, apesar do aumento dos níveis de IL-6 e IL-17 (Gráfico 6).

Os resultados de IL-5 demonstrou um aumento progressivo a partir do 3 dpi até o 7 dpi (Gráfico 6A). O aumento de citocina no 3 dpi também foi observado para a IL-6 (Gráfico 6B). Os resultados de IL-4, IL-13 e IL-17 tiveram mesmo padrão de resposta, caracterizado pelo aumento no 14 dpi quando comparado com o grupo não infectado (0 dpi) (Gráfico 6C, 6D e 6E). A IL-33, apesar de não estatisticamente, revelou aumento no 5 dpi em comparação com animais não infectados (Gráfico 6F). Os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 não apresentaram diferenças entre grupos (Gráfico 6G, 6H e 6I).



**Gráfico 6. Níveis plasmáticos de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis*. n = 6 animais por tempo de infecção. Dados representados em média geométrica. Diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas Dunn. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .**

## **PARTE 2**

**Verificação do efeito do exercício físico moderado na infecção experimental por  
*Toxocara canis* em camundongos BALB/c adultos.**

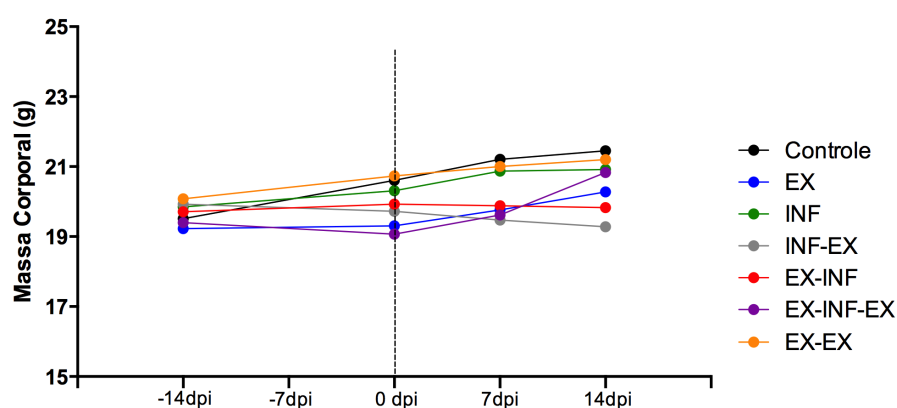


## V.6. Análise do protocolo de exercício físico em camundongos BALB/c infectados ou não por *Toxocara canis*

### V.6.1. Análise do desenvolvimento corporal dos camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

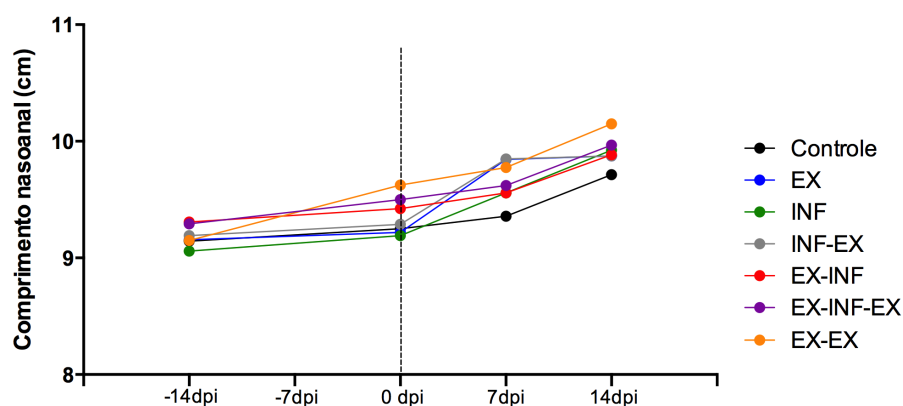
Diante da necessidade de compreender qual a influência da infecção por *T. canis* e do exercício físico no desenvolvimento corporal de camundongos BALB/c, foi mensurado a massa corporal (Gráfico 7) e o comprimento nasoanal (Gráfico 8) no período anterior à submissão dos animais ao protocolo de exercício físico, o qual corresponde com a idade de 8 semanas de vida dos camundongos, no dia da infecção por *T. canis* (0 dpi), 7 e 14 dias pós-infecção (dpi).

O gráfico 7 mostra que não houve variação significativa da massa corporal dos grupos infectado ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.



**Gráfico 7. Massa corporal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por *Toxocara canis*.** CONTROLE (n=7): sedentário sem infecção, EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, -14 dpi = 8 semanas de idade e antes da submissão ao protocolo de exercício físico aos grupos 'previamente exercitados', 0 dpi (linha pontilhada) = 10 semanas de idade, dia da infecção por *T. canis* e início do protocolo de exercício físico aos grupos exercitados, 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média dos grupos experimentais.

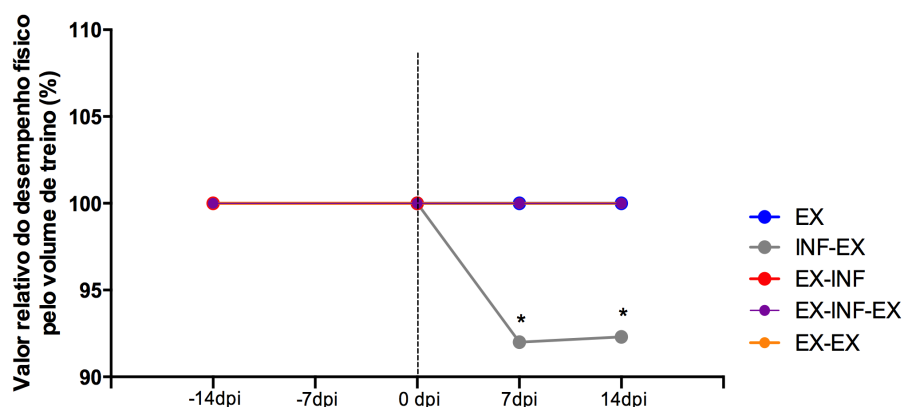
O comprimento nasoanal dos animais também não apresentou variação significativa dos grupos infectado ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico, conforme representado no gráfico 8.



**Gráfico 8. Comprimento nasoanal de camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por *Toxocara canis*.** CONTROLE (n=7): sedentário sem infecção, EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, -14 dpi = 8 semanas de idade e antes da submissão ao protocolo de exercício físico aos grupos ‘previamente exercitados’, 0 dpi (linha pontilhada) = 10 semanas de idade, dia da infecção por *T. canis* e início do protocolo de exercício físico aos grupos exercitados, 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média dos grupos experimentais.

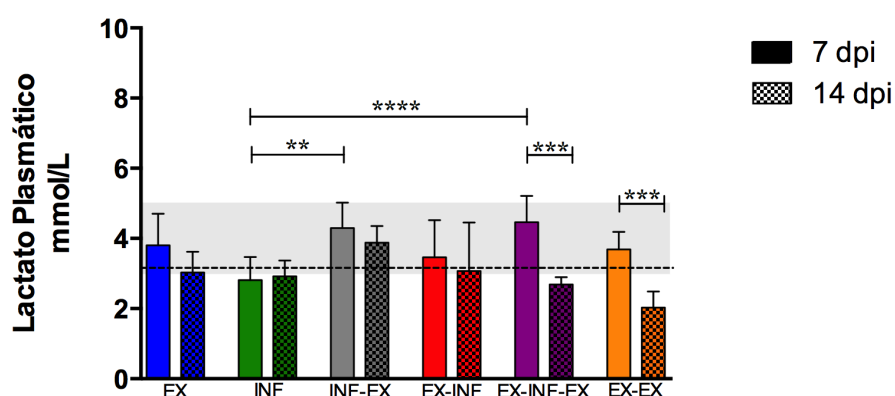
### V.6.2. Análise do desempenho físico e intensidade de esforço dos camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ao protocolo de exercício físico

O desempenho físico dos grupos submetidos ao protocolo de exercício físico está representado no gráfico 9. Nota-se que os grupos EX, EX-INF, EX-INF-EX e EX-EX cumpriram 100% do volume de treino proposto, o qual foi de 90 minutos de natação diária, resultando em 630 minutos/semana de natação. Os grupos EX-INF, EX-INF-EX e EX-EX iniciaram o treinamento físico 14 dias antes da infecção por *T. canis*, porém no dia da infecção, o grupo EX-INF interrompeu o treinamento físico, a fim de verificar a influência da infecção por *T. canis* no organismo previamente exercitado. Tanto o grupo EX-INF-EX quanto o EX-EX realizaram 28 dias de treinamento físico. O grupo INF-EX iniciou o treinamento no mesmo dia que foi infectado por *T. canis*, e percebe-se que com 7 dpi o volume de treino foi para 92,00% e com 14 dpi foi para 92,31%. A diminuição do volume de treino foi caracterizada pelos animais que não suportaram completar o treinamento físico, permanecendo submersos a água por 10 segundos sem retornar a superfície.



**Gráfico 9. Desempenho físico pelo volume total de treino de camundongos BALB/c submetidos ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por *Toxocara canis*.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, -14 dpi = 8 semanas de idade e antes da submissão ao protocolo de exercício físico aos grupos 'previamente exercitados', 0 dpi (linha pontilhada) = 10 semanas de idade, dia da infecção por *T. canis* e início do protocolo de exercício físico aos grupos exercitados, 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*p<0,05.

A intensidade de esforço durante o desempenho físico dos grupos submetidos ao protocolo de exercício físico foi avaliada pela concentração de lactato no sangue. Conforme citado anteriormente, esse biomarcador tem sua concentração elevada no sangue proporcional a maior intensidade de esforço físico realizado. No gráfico 10 está representada a concentração de lactato no sangue no 7 e 14 dpi, de todos os grupos submetidos ao protocolo de exercício físico. De acordo com os resultados, a concentração de lactato plasmático confirmou a intensidade moderada do protocolo de exercício físico adotado. Observa-se que somente os grupos EX-INF-EX e EX-EX após 28 dias de treinamento físico de natação (14 dpi) apresentaram concentração menor de lactato no sangue quando comparado com seu período de 21 dias de natação (7 dpi), o que indica que estes grupos adaptaram metabolicamente a intensidade do protocolo de natação.



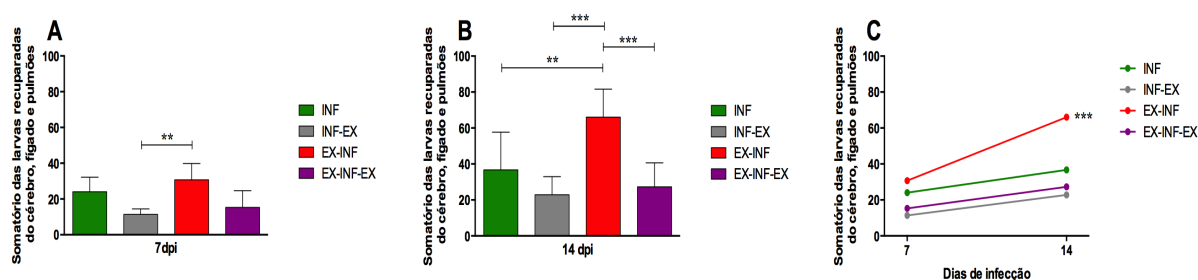
**Gráfico 10. Concentração de lactato plasmático submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por *Toxocara canis*.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## V.7. Análise parasitológica da quantificação das larvas de *Toxocara canis* em camundongos BALB/c submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

### V.7.1. Quantificação das larvas em camundongos infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

A quantificação das larvas dos grupos infectados com 1000 ovos de *T. canis* foi determinada pelo somatório das larvas recuperadas dos órgãos fígado, pulmões e cérebro. O gráfico 11A mostra que com 7 dpi, o grupo EX-INF possui maior quantidade de larvas que o grupo INF-EX, enquanto com 14 dpi, o grupo EX-INF possui maior quantidade de larvas que todos os demais grupos infectados (Gráfico 11B).

O gráfico 11C representa a quantidade de larvas recuperadas do cérebro, fígado e pulmões com relação ao tempo de infecção por *T. canis*. Nele, o grupo EX-INF mostrou aumento significativo no 14 dpi quando comparado com seu 7 dpi.

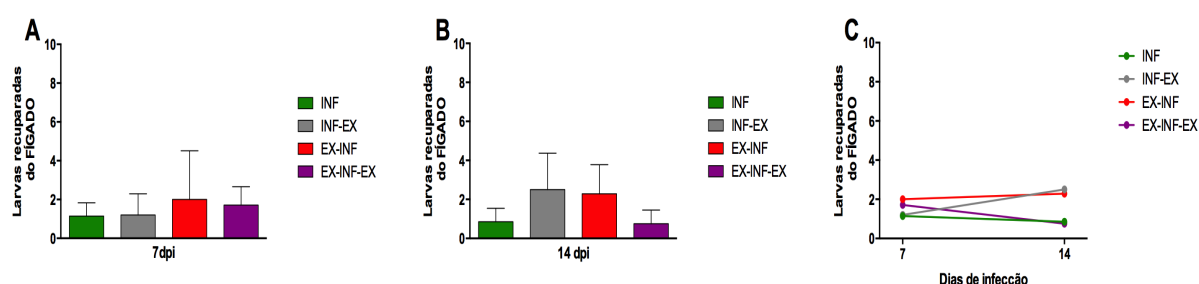


**Gráfico 11. Quantificação das larvas pelo somatório de larvas recuperadas do cérebro, fígado e pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, A = infecção no 7 dias pós-infecção (dpi), B = infecção no 14 dpi, C = evolução temporal da infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

O baço, coração, língua e o músculo gastrocnêmio foram coletados dos grupos infectados por *T. canis* para verificar a presença de larvas encistadas. Foi encontrada 1 larva no músculo gastrocnêmio do grupo INF com 14 dpi e 3 larvas na língua do grupo EX-INF-EX com 14 dpi. Nos demais tecidos não foram encontradas larvas encistadas.

### V.7.2. Quantificação das larvas de *Toxocara canis* no tecido hepático de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

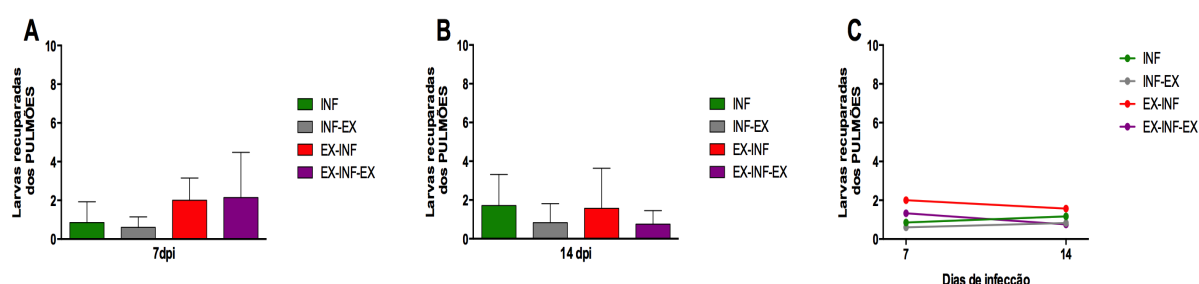
No fígado dos camundongos infectados e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico foram recuperadas larvas de *T. canis*, o qual os dados estão representados no gráfico 12. Os resultados não mostraram diferença entre grupos com 7 (Gráfico 12A) e 14 dpi (Gráfico 12B), nem mesmo com relação ao tempo de infecção (Gráfico 12C), indicando que com esse período de infecção as larvas já haviam migrado para outros tecido.



**Gráfico 12. Larvas recuperadas do tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, A = infecção no 7 dias pós-infecção (dpi), B = infecção no 14 dpi, C = evolução temporal da infecção. Dados representados em média ± desvio padrão dos grupos experimentais.

### V.7.3. Quantificação das larvas de *Toxocara canis* no tecido pulmonar de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

A recuperação das larvas de *T. canis* nos pulmões dos camundongos infectados e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico está demonstrada no gráfico 13. Assim como no tecido hepático, os resultados não mostraram diferença entre grupos com 7 (Gráfico 13A) e 14 dpi (Gráfico 13B), nem mesmo com relação ao tempo de infecção (Gráfico 13C), sugerindo que as larvas encontradas estavam retidas no tecido.

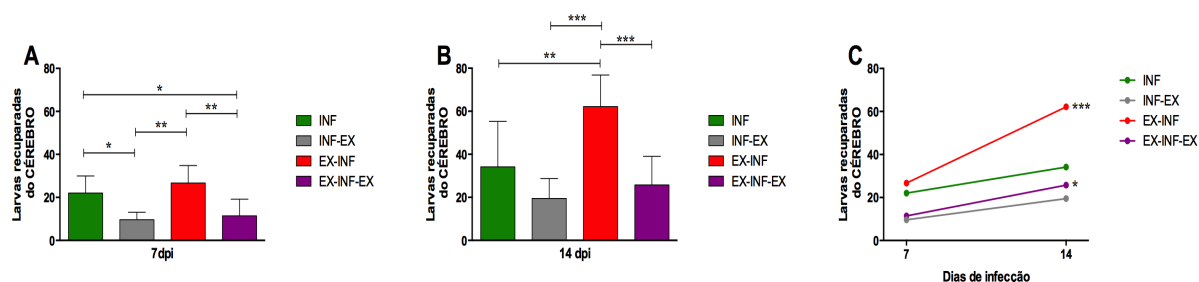


**Gráfico 13. Larvas recuperadas do tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, A = infecção no 7 dias pós-infecção (dpi), B = infecção no 14 dpi, C = evolução temporal da infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais.

#### V.7.4. Quantificação das larvas de *Toxocara canis* no tecido cerebral de camundongos submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

A recuperação das larvas de *T. canis* no cérebro dos camundongos infectados e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico está demonstrada no gráfico 14. No 7 dpi percebe-se que o grupo INF e EX-INF tiveram maior quantidade de larvas que os grupos INF-EX e EX-INF-EX (Gráfico 14A). No 14 dpi, o grupo EX-INF apresentou maior quantidade de larvas que todos os demais grupos infectados (Gráfico 14B).

A quantidade de larvas de *T. canis* recuperadas no tecido cerebral com relação ao tempo de infecção está demonstrada no gráfico 14C. Os grupos exercitados previamente (EX-INF e EX-INF-EX) mostraram maior quantidade no 14 dpi quando comparado com seu resultado no 7 dpi.



**Gráfico 14. Larvas recuperadas do tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, A = infecção no 7 dias pós-infecção (dpi), B = infecção no 14 dpi, C = evolução temporal da infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



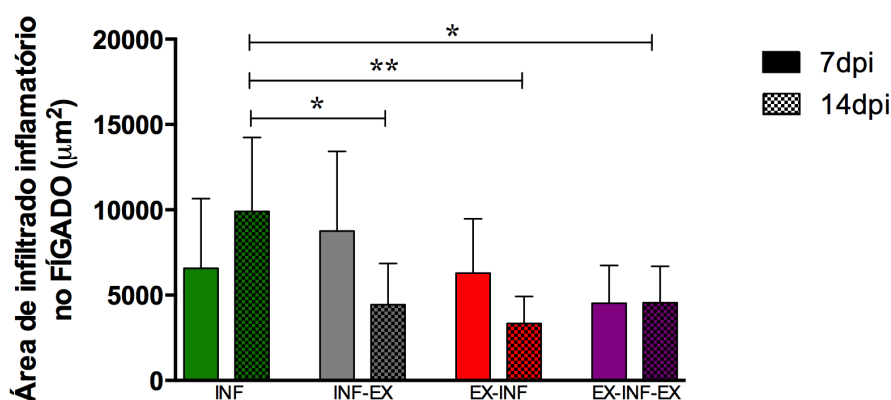
## V.8. Análise histopatologia em camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

Para identificar a integridade tecidual de camundongos infectado por *T. canis* e o efeito modulador do protocolo de exercício físico nestes animais, foi analisado o tecido hepático, pulmonar e cerebral, morfologicamente de forma qualitativa e quantitativa.

### V.8.1. Análise da área de infiltrado inflamatório no tecido hepático em camundongos infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

No fígado de camundongos infectado por *T. canis* e submetido ou não ao protocolo de exercício físico foi identificado infiltrado inflamatório com predominância de leucócitos polimorfonucleares, além da presença de larvas.

A área de infiltrado inflamatório avaliada da área de  $15,38 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  de cada corte histológico do fígado de animais infectados está representada no gráfico 15. Os dados mostraram que a área do infiltrado inflamatório no grupo INF com 14 dpi por *T. canis* foi maior que a área nos grupos EX-INF e EX-INF-EX, também com 14 dpi. Com esses achados pode-se especular que o treinamento físico previamente à infecção contribui para uma regeneração do tecido hepático após 14 dias de infecção.



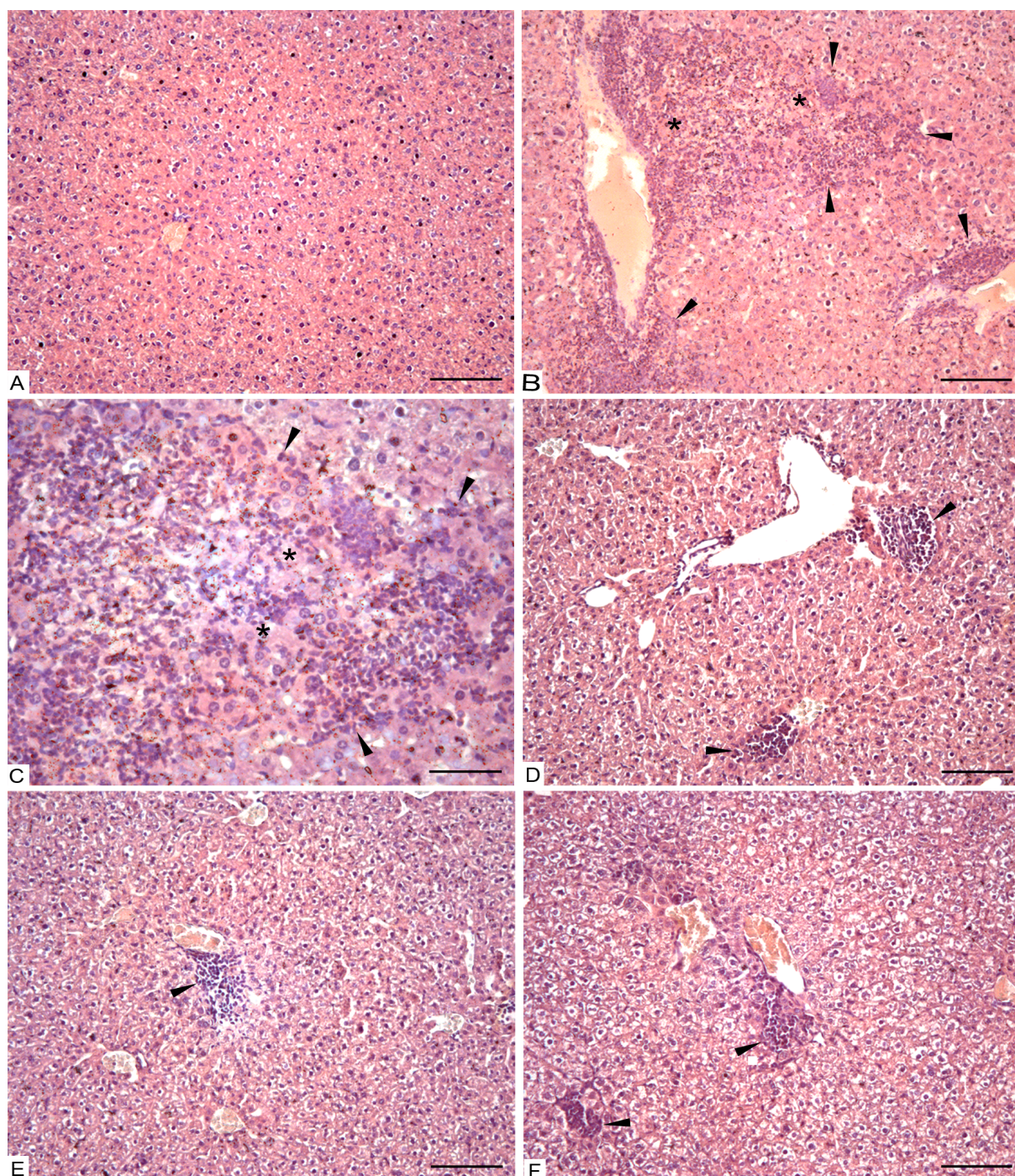
**Gráfico 15. Área de infiltrado inflamatório do fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=6): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=6): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

A análise histopatológica do fígado dos animais dos grupos sem infecção (CONTROLE, EX e EX-EX) demonstrou aspecto histológico normal, com o parênquima hepático constituído pela veia centro lobular circundada por cordões de hepatócitos e por capilares sinusoides; e os hepatócitos estavam com formato poligonal e núcleo esférico centralizado, conforme representado na figura 4a.

No fígado dos animais infectados (INF, INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) com 7 dpi foi observado regiões com moderado infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal constituído principalmente por eosinófilos e neutrófilos, e pequenas regiões com necrose dos hepatócitos. Também foi observado moderado infiltrado inflamatório perivascular. Assim como os animais infectados e exercitados (INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) com 14 dpi.

No fígado dos animais infectados e sedentários (INF) com 14 dpi foi observado lesões do parênquima hepático caracterizadas por regiões com intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear constituído por eosinófilos e neutrófilos, e áreas com necrose hepática moderada associada ao infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Também foi observada no parênquima hepático destes animais a presença intensa de infiltrado inflamatório perivascular (Figura 4b, 4c, 4d, 4e e 4f).



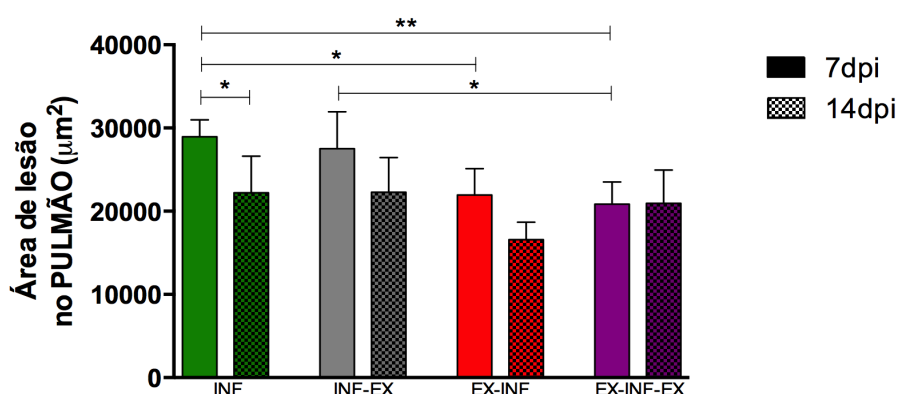


**Figura 4. Fotomicrografia da área de infiltrado inflamatório no fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** (A) Grupo não infectado com parênquima hepático normal. H&E. Barra: 100  $\mu$ m. (B) Grupo sedentário com infecção (INF) com 14 dias pós-infecção (dpi) com presença de intenso infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e necrose hepática (\*). H&E. Barra: 100  $\mu$ m. (C) Figura anterior com aumento mostrando infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos e neutrófilos (cabeça das setas), bem como a presença de necrose (\*). H&E. Barra: 50 $\mu$ m. (D) Grupo exercitado com infecção (INF-EX) com 14 dpi com pequenas áreas com infiltrado inflamatório (cabeça das setas). H&E. Barra: 100 $\mu$ m. (E) Grupo exercitado previamente e infectado sem exercício (EX-INF) com 14 dpi com discretas áreas com infiltrado inflamatório (cabeça das setas). H&E. Barra: 100 $\mu$ m. (F) Grupo exercitado previamente, infectado com exercício (EX-INF-EX) com 14 dpi com pequenas áreas com infiltrado inflamatório (cabeça das setas). H&E. Barra: 100 $\mu$ m.



### V.8.2. Análise do espessamento do septo no tecido pulmonar em camundongos infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

Nos pulmões de camundongos infectado por *T. canis* e submetido ou não ao protocolo de exercício físico foi identificado infiltrado inflamatório com presença predominante de eosinófilos, linfócitos e macrófagos ocasionando o espessamento do septo como área de lesão nos pulmões. O gráfico 16 mostra a análise da área de lesão em  $15,25 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  de cada corte histológico dos pulmões de animais infectados. Os dados mostraram que a área lesionada no grupo INF com 7 dpi por *T. canis* foi maior com seu 14 dpi, assim como com os grupos previamente exercitados com 7 dpi (EX-INF e EX-INF-EX). O grupo INF-EX com 7 dpi também apresentou maior área lesionada que o EX-INF-EX com 7 dpi. Isto permite dizer que o treinamento prévio pode diminuir o espessamento do septo já com 7 dpi.

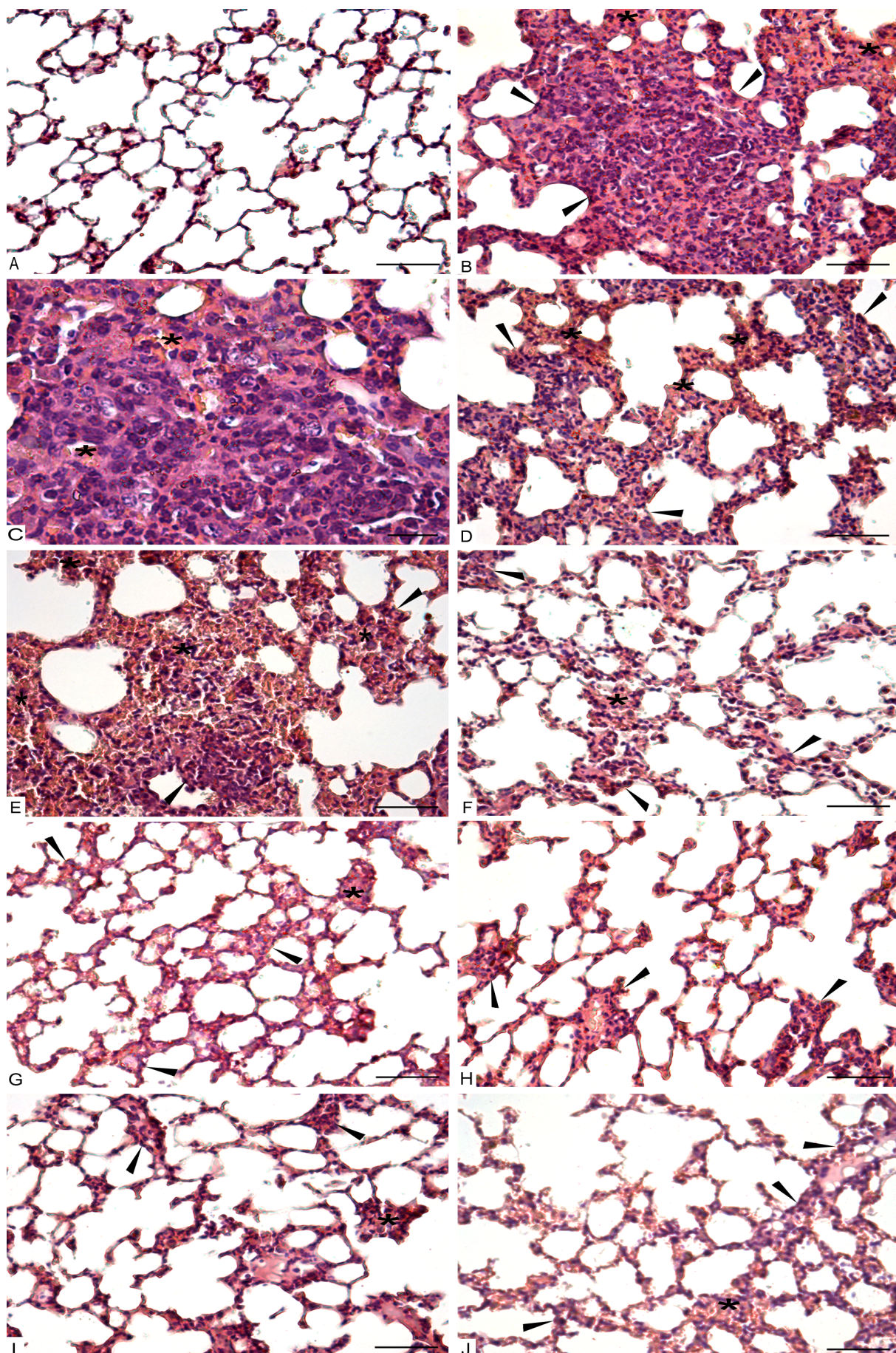


**Gráfico 16. Área de espessamento do septo dos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=6): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=6): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

A análise histopatológica dos pulmões dos animais dos grupos sem infecção (CONTROLE, EX e EX-EX) demonstrou aspecto histológico normal, com alvéolos aerados e septos interlobulares e alveolares de espessura normal, conforme representado na figura 5a.

Com 7 dpi, os pulmões dos animais do grupo INF apresentou o parênquima pulmonar caracterizadas por amplo espessamento dos septos interalveolares pela presença de intenso infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, e de zonas hemorrágicas. Também foi encontrado o infiltrado inflamatório preenchendo lúmens alveolares e junto aos bronquíolos e vasos sanguíneos, com o mesmo perfil celular do infiltrado presente nos septos interalveolares (Figura 5b e 5c). Os animais do grupo INF-EX exibiram os mesmos achados histopatológicos que os animais do grupo INF, porém apresentaram zonas hemorrágicas mais exuberantes (Figura 5e), enquanto os animais dos grupos EX-INF (Figura 5g) e EX-INF-EX (Figura 5i) apresentaram uma redução na área de espessamento dos septos alveolares devido a diminuição da inflamação e da hemorragia quando comparados com os grupos infectados sem treinamento prévio (INF e INF-EX).

Com 14 dpi, os pulmões dos animais dos grupos INF (Figura 5d), INF-EX (Figura 5f), EX-INF (Figura 5h) e EX-INF-EX (Figura 5j) demonstraram a presença de lesões do parênquima pulmonar caracterizadas por espessamento dos septos interalveolares devido à presença de infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, e ocasionalmente este infiltrado encontrava-se acompanhado por discretas zonas hemorrágicas. Também foi encontrado a presença de alvéolos com o lúmen preenchido por infiltrado inflamatório em todos os grupos, além de apresentarem um aumento significativo do número de macrófagos alveolares.

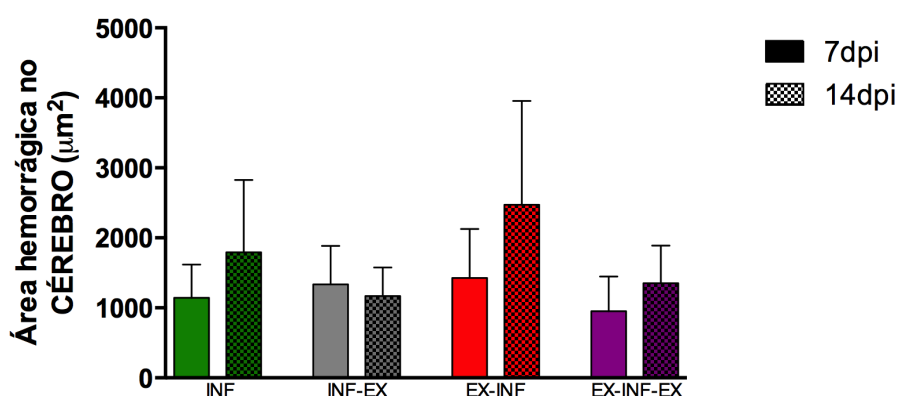




**Figura 5. Fotomicrografia do espessamento do septo nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** (A) Grupo não infectado com parênquima pulmonar normal. H&E. Barra: 50 µm. (B) Grupo sedentário com infecção (INF) com 7 dias pós-infecção (dpi) com intenso espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm; (C) Figura anterior com aumento mostrando infiltrado inflamatório constituído por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, bem como a presença de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 20 µm. (D) Grupo INF com 14 dpi com espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (E) Grupo exercitado com infecção (INF-EX) com 7 dpi com intenso espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (F) Grupo INF-EX com 14 dpi com espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (G) Grupo previamente e infectado sem exercício (EX-INF) com 7 dpi com reduzido espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (H) EX-INF com 14 dpi com espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (I) Grupo exercitado previamente, infectado com exercício (EX-INF-EX) com 7 dpi com reduzido espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm. (J) EX-INF-EX com 14 dpi com espessamento dos septos interalveolares às custas de infiltrado inflamatório (cabeça das setas) e de zonas hemorrágicas (\*). H&E. Barra: 50 µm.

### V.8.3. Análise da área de hemorragia no tecido cerebral em camundongos infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

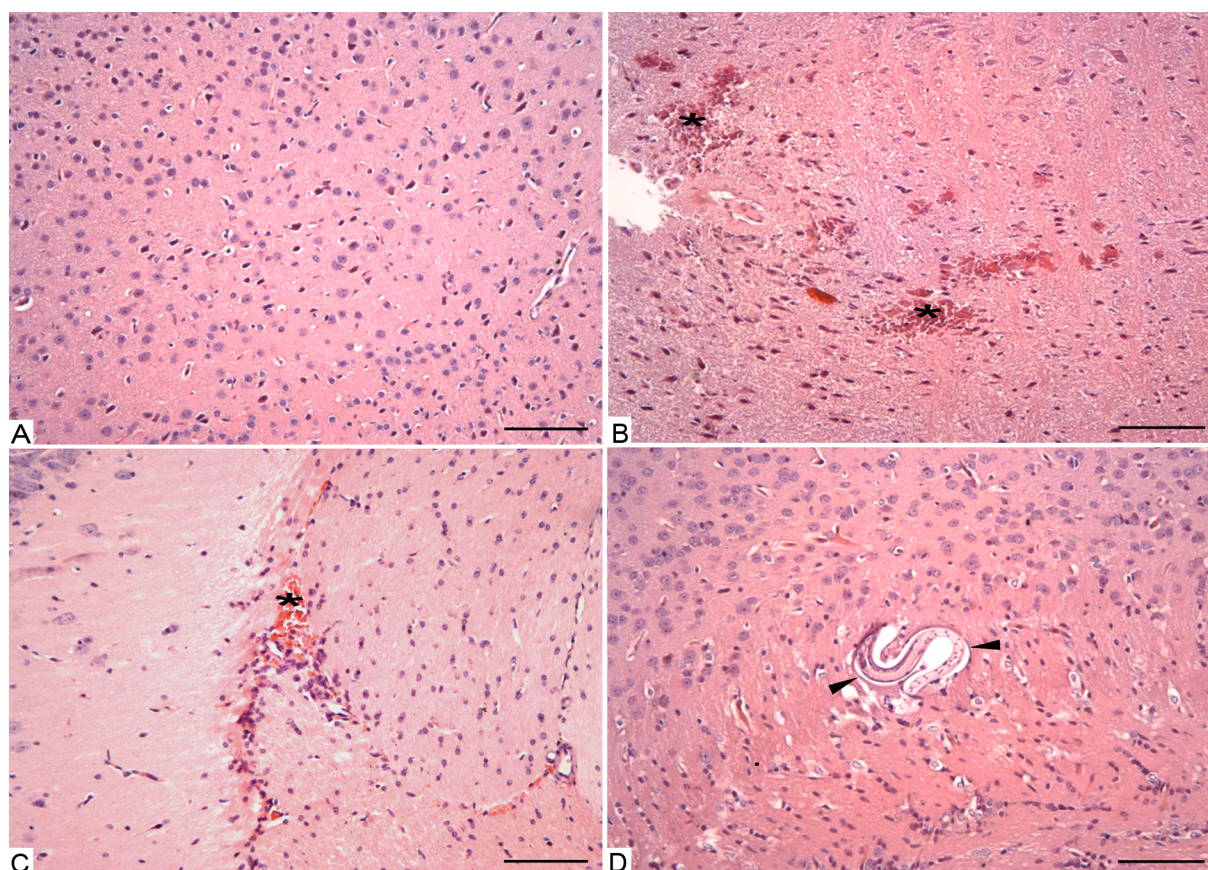
No cérebro de camundongos infectado por *T. canis* e submetido ao protocolo de exercício físico foi identificadas áreas com hemorragia e presença de larvas. No gráfico 17 está representada a morfometria da área hemorrágica no cérebro de animais infectados por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico. A área hemorrágica foi avaliada da área de  $15,38 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  de cada corte histológico do cérebro e os resultados não mostraram diferença estatística dos grupos experimentais quando comparados entre si.



**Gráfico 17. Área hemorrágica do cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** INF (n=6): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=6): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais.



Na avaliação histopatológica, o parênquima cerebral dos grupos não infectado por *T. canis* (CONTROLE, EX e EX-EX) apresentaram aspecto histológico normal (Figura 6a). O cérebro dos animais infectados (INF, INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) com 7 e 14 dpi mostraram lesões parenquimatosas caracterizadas por cavidades hemorrágicas (Figura 6b) e larvas espalhadas foram visualizados no cérebro e tronco cerebral (Figura 6c).



**Figura 6. Fotomicrografia da área hemorrágica e de larvas no cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** (A) Grupo não infectado com parênquima cerebral normal. H&E. Barra = 100 µm. (B) Grupo 7 dias pós-infecção (dpi): presença de áreas hemorrágicas (\*). H&E. Barra = 100 µm. (C) Grupo 14 dpi: presença de áreas hemorrágicas (\*). H&E. Barra = 100 µm. (D) Grupo 14 dpi: presença de larva (cabeça da seta). H&E. Barra = 100 µm.

## **V.9. Análise do sangue periférico de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico**

### **V.9.1. Caracterização do perfil leucocitário de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico**

A resposta imune leucocitária no sangue de camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico está demonstrada na tabela 2.

Os grupos exercitados previamente à infecção (EX-INF E EX-INF-EX) com 7 dpi apresentaram leucocitose quando comparado com os grupos sem infecção (CONTROLE, EX e EX-EX), porém com 14 dpi essa leucocitose diminuiu. O INF-EX apresentou uma leucocitose com 14 dpi. A linfocitose ocorreu somente no EX-INF com 7dpi. Os monócitos foram maiores no grupo EX-INF-EX com 7 e 14 dpi que nos grupos sem infecção (CONTROLE) e submetido ao mesmo período de treinamento (EX-EX). Todos os grupos demonstraram maior quantidade de neutrófilos quando comparado com o controle, e o grupo EX-INF-EX com 7 dpi apresentou neutrofilia. A eosinofilia de 6 a 21% foi encontrada em todos os grupos infectados (INF, INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) tanto com 7 dpi quanto com 14 dpi. Os monócitos não mostraram diferença estatística (dado não representado na tabela).

**Tabela 2. Perfil leucocitário de camundongos BALB/c infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.**

|                  |        | LEUCÓCITOS<br>TOTAIS<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) | LINFÓCITO<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)     | MONÓCITO<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)  | NEUTRÓFILO<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)      | EOSINÓFILO<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) |
|------------------|--------|---|--|--------------------------------------|--|---------------------------------------|
| <b>Controle</b>  |        | 5,7 ± 1,4                                       | 4,7 ± 1,3<br>(74-88%)                    | 0,09 ± 0,04<br>(0-3%)                | 0,8 ± 0,4<br>(7-23%)                       | 0,0 ± 0,0<br>(0-1%)                   |
| <b>EX</b>        | 7 dpi  | 5,7 ± 1,5 <sup>d</sup>                          | 4,7 ± 1,2 <sup>d</sup><br>(76-88%)       | 0,08 ± 0,06<br>(0-3%)                | 0,8 ± 0,4<br>(10-20%)                      | 0,0 ± 0,0 <sup>b,c,d</sup><br>(0-1%)  |
|                  | 14 dpi | 7,5 ± 1,1                                       | 4,6 ± 0,8<br>(52-70%)                    | 0,11 ± 0,08<br>(0-3%)                | 2,8 ± 0,8 <sup>*,#</sup><br>(28-46%)       | 0,0 ± 0,0 <sup>b,c,d</sup><br>(0-1%)  |
| <b>INF</b>       | 7 dpi  | 8,6 ± 4,3                                       | 5,9 ± 2,6<br>(63-77%)                    | 0,15 ± 0,18<br>(0-3%)                | 1,4 ± 0,5 <sup>*,e</sup><br>(13-21%)       | 1,1 ± 1,3 <sup>*,a</sup><br>(6-21%)   |
|                  | 14 dpi | 7,9 ± 0,9                                       | 4,9 ± 0,7<br>(56-67%)                    | 0,19 ± 0,10<br>(1-3%)                | 1,5 ± 0,5 <sup>*,c,e</sup><br>(13-26%)     | 1,2 ± 0,3 <sup>*,a</sup><br>(11-21%)  |
| <b>INF-EX</b>    | 7 dpi  | 8,2 ± 2,0                                       | 4,6 ± 0,9 <sup>d</sup><br>(49-63%)       | 0,20 ± 0,11<br>(1-4%)                | 2,0 ± 0,7 <sup>*,b,e</sup><br>(21-29%)     | 1,3 ± 0,6 <sup>*,a</sup><br>(11-21%)  |
|                  | 14 dpi | 9,3 ± 1,6 <sup>*</sup>                          | 4,8 ± 1,0<br>(44-60%)                    | 0,19 ± 0,11<br>(1-4%)                | 3,3 ± 1,0 <sup>*,#d</sup><br>(29-63%)      | 0,8 ± 0,4 <sup>*,a</sup><br>(5-15%)   |
| <b>EX-INF</b>    | 7 dpi  | 10,7 ± 3,7 <sup>*,a</sup>                       | 7,3 ± 2,2 <sup>*,a,c,e</sup><br>(63-75%) | 0,15 ± 0,06<br>(1-3%)                | 2,2 ± 1,1 <sup>*,e</sup><br>(15-25%)       | 1,0 ± 0,6 <sup>*,a</sup><br>(6-14%)   |
|                  | 14 dpi | 8,2 ± 1,7                                       | 5,0 ± 1,0<br>(55-70%)                    | 0,14 ± 0,08<br>(0-3%)                | 2,1 ± 1,1 <sup>*,c</sup><br>(15-35%)       | 0,8 ± 0,5 <sup>*,a</sup><br>(5-17%)   |
| <b>EX-INF-EX</b> | 7 dpi  | 10,9 ± 2,7 <sup>*,f</sup>                       | 4,8 ± 1,5 <sup>d</sup><br>(37-50%)       | 0,23 ± 0,10 <sup>*,f</sup><br>(1-4%) | 4,3 ± 1,3 <sup>*,b,c,d,f</sup><br>(34-46%) | 1,4 ± 0,5 <sup>*,f</sup><br>(9-17%)   |
|                  | 14 dpi | 7,6 ± 1,7 <sup>#</sup>                          | 3,6 ± 1,1<br>(39-55%)                    | 0,18 ± 0,07 <sup>f</sup><br>(1-4%)   | 3,0 ± 0,7 <sup>*,#b</sup><br>(33-47%)      | 0,8 ± 0,3 <sup>*,f</sup><br>(7-14%)   |
| <b>EX-EX</b>     | 7 dpi  | 6,1 ± 1,6 <sup>e</sup>                          | 3,8 ± 1,3<br>(49-74%)                    | 0,09 ± 0,07 <sup>e</sup><br>(1-3%)   | 2,2 ± 0,8 <sup>*,e</sup><br>(24-50%)       | 0,0 ± 0,0 <sup>e</sup><br>(0-1%)      |
|                  | 14 dpi | 5,1 ± 1,3                                       | 3,1 ± 0,8<br>(52-70%)                    | 0,04 ± 0,05 <sup>e</sup><br>(0-2%)   | 1,9 ± 0,7<br>(29-47%)                      | 0,0 ± 0,0 <sup>e</sup><br>(0-1%)      |

Dados representados em média ± desvio padrão e valores relativos dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*Diferente do grupo sedentário sem infecção (CONTROLE, n=14), <sup>#</sup>Diferente do seu 7 dias pós-infecção (dpi), <sup>a</sup>Diferente do grupo exercitado sem infecção por 14 dias (EX, n=8), <sup>b</sup>Diferente do grupo sedentário com infecção (INF, n=7), <sup>c</sup>Diferente do grupo exercitado com infecção (INF-EX, n=6), <sup>d</sup>Diferente do grupo exercitado previamente e infectado sem exercício (EX-INF, n=7), <sup>e</sup>Diferente do grupo exercitado previamente e infectado com exercício (EX-INF-EX, n=7), <sup>f</sup>Diferente do grupo exercitado sem infecção por 28 dias (EX-EX, n=10).

### V.9.2. Caracterização do perfil eritrocitário e plaquetário de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

A resposta eritrocitária e das plaquetas no sangue de camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico está demonstrada na tabela 3.

Os resultados dos glóbulos vermelhos não apresentaram diferenças nos grupos com 7 dpi. Já com 14 dpi, o grupo exercitado sem infecção (EX) apresentou quantidade de eritrócitos maior que o grupo exercitado com infecção (INF-EX), porém sem diferença na concentração de hemoglobina. A hemoglobina teve diferença somente entre os grupos exercitados por 28 dias, sendo que o grupo exercitado sem infecção (EX-EX) teve maior concentração de hemoglobina que o grupo exercitado com infecção (EX-INF-EX).

A quantidade de plaquetas no sangue foi maior no grupo previamente exercitado com infecção (EX-INF) com 14 dpi que com 7 dpi. Para os grupos exercitados por 28 dias, a concentração de plaqueta foi maior no grupo exercitado sem infecção (EX-EX) que no grupo exercitado com infecção (EX-INF-EX).

**Tabela 3. Perfil eritrocitário e plaquetário de camundongos BALB/c infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.**

|                  |        | ERITÓCITO<br>(x 10 <sup>6</sup> /μL) | HEMOGLOBINA<br>(g/dL)   | PLAQUETA<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) |
|------------------|--------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| <b>Controle</b>  |        | 8,6 ± 1,6                            | 14,9 ± 3,1              | 364 ± 155                           |
| <b>EX</b>        | 7 dpi  | 9,0 ± 0,4                            | 15,8 ± 0,9              | 410 ± 121                           |
|                  | 14 dpi | 9,7 ± 0,5 <sup>c</sup>               | 16,5 ± 0,9              | 483 ± 232                           |
| <b>INF</b>       | 7 dpi  | 8,0 ± 0,6                            | 14,1 ± 1,0              | 290 ± 80                            |
|                  | 14 dpi | 8,4 ± 0,4                            | 14,6 ± 0,9              | 429 ± 101                           |
| <b>INF-EX</b>    | 7 dpi  | 8,3 ± 0,5                            | 14,1 ± 0,9              | 353 ± 80                            |
|                  | 14 dpi | 8,3 ± 0,2 <sup>a</sup>               | 13,7 ± 0,6              | 385 ± 112                           |
| <b>EX-INF</b>    | 7 dpi  | 8,6 ± 0,7                            | 14,1 ± 2,8              | 329 ± 110                           |
|                  | 14 dpi | 9,2 ± 0,6                            | 15,6 ± 1,1              | 532 ± 151 <sup>#</sup>              |
| <b>EX-INF-EX</b> | 7 dpi  | 8,5 ± 0,6                            | 14,2 ± 1,0 <sup>f</sup> | 342 ± 73 <sup>f</sup>               |
|                  | 14 dpi | 8,8 ± 0,4                            | 15,1 ± 0,6              | 446 ± 108                           |
| <b>EX-EX</b>     | 7 dpi  | 9,3 ± 0,5                            | 18,1 ± 0,4 <sup>e</sup> | 640 ± 271 <sup>e</sup>              |
|                  | 14 dpi | 8,8 ± 1,6                            | 17,3 ± 3,6              | 574 ± 228                           |

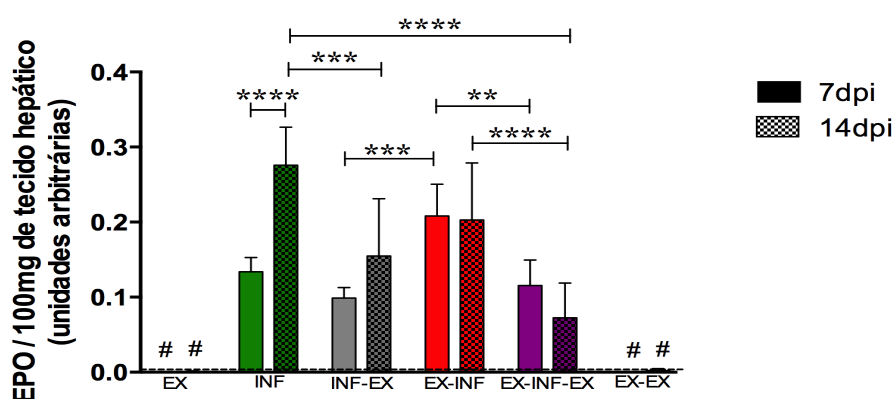
Dados representados em média ± desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. \*Diferente do grupo sedentário sem infecção (CONTROLE, n=14), <sup>#</sup>Diferente do seu 7 dias pós-infecção (dpi), <sup>a</sup>Diferente do grupo exercitado sem infecção por 14 dias (EX, n=8), <sup>b</sup>Diferente do grupo sedentário com infecção (INF, n=7), <sup>c</sup>Diferente do grupo exercitado com infecção (INF-EX, n=6), <sup>d</sup>Diferente do grupo exercitado previamente e infectado sem exercício (EX-INF, n=7), <sup>e</sup>Diferente do grupo exercitado previamente e infectado com exercício (EX-INF-EX, n=7), <sup>f</sup>Diferente do grupo exercitado sem infecção por 28 dias (EX-EX, n=10).

## V.10. Análise da resposta imune leucocitária tecidual em camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

### V.10.1. Caracterização da atividade da peroxidase de eosinófilos no tecido hepático, pulmonar e cerebral de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

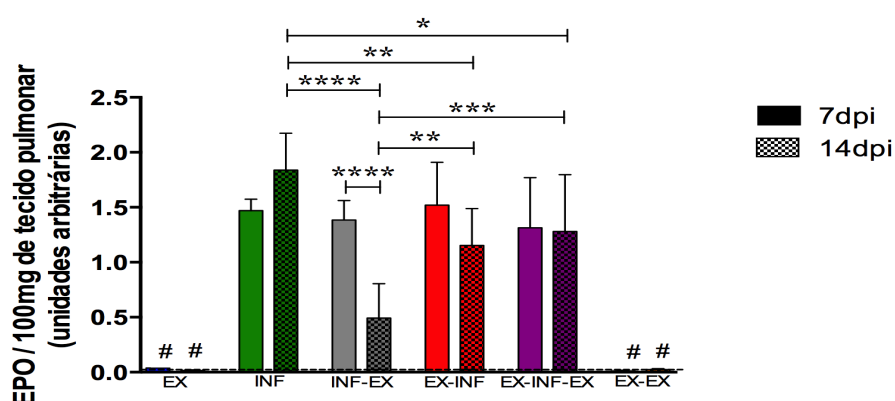
A atividade enzimática da peroxidase de eosinófilos (EPO) foi avaliada nos tecidos do fígado, pulmão e cérebro dos camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.

O gráfico 18 mostra a atividade da EPO por 100mg de tecido hepático, no qual todos os animais infectado tiveram maior atividade da EPO que os animais não infectados. No 7 dpi, o EX-INF apresentou maior valor do que os grupos INF-EX e EX-INF-EX. O INF com 7 dpi mostrou menor valor quando comparado com seus respectivos grupo no 14 dpi. O INF com 14 dpi foi maior que os grupos INF-EX e EX-INF-EX também com 14 dpi, o qual este último foi menor que o EX-INF com 14 dpi.



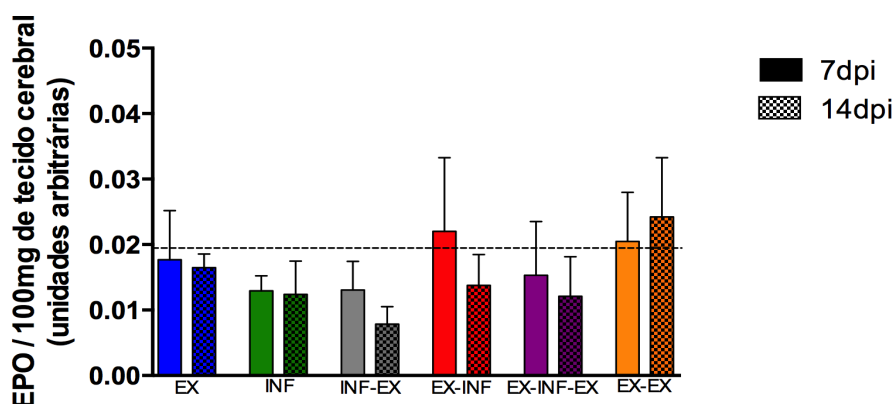
**Gráfico 18. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA one way e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p<0,05$ ) de todos os demais grupos do seu mesmo período de infecção (7 dpi ou 14 dpi). \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ .

O gráfico 19 mostra a atividade da EPO por 100mg de tecido pulmonar, no qual todos os animais infectado tiveram maior atividade da EPO que os animais não infectados. O INF-EX apresentou maior valor quando comparado com seu respectivo grupo no 14 dpi. No 14 dpi, o grupo INF mostrou maior valor que os grupos exercitados e infectados (INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX), e o INF-EX apresentou menor valor que os grupos EX-INF e EX-INF-EX.



**Gráfico 19. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) de todos os demais grupos do seu mesmo período de infecção (7 dpi ou 14 dpi). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

O gráfico 20 mostra a atividade da EPO por 100mg de tecido cerebral, no qual não apresentou diferenças entre grupos.



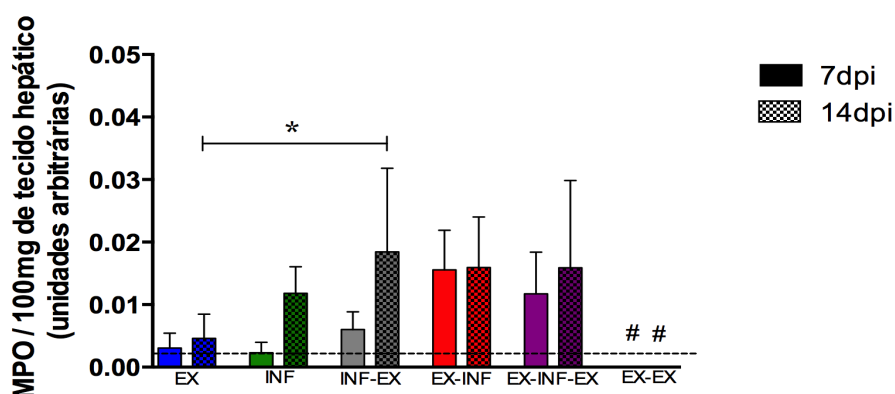
**Gráfico 20. Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.



### V.10.2. Caracterização da atividade da mieloperoxidase no tecido hepático, pulmonar e cerebral de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

A atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos foi avaliada nos tecidos do fígado, pulmão e cérebro dos camundongos infectados ou não por *T. canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.

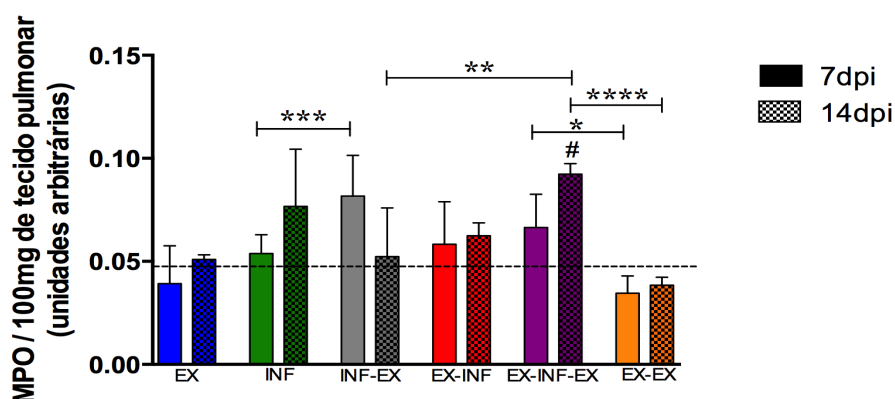
No gráfico 21 está representado a MPO por 100mg de tecido hepático. Com 14 dpi, o INF-EX apresentou maior valor que o EX. Já os grupos exercitados por 28 dias apresentaram maiores valores quando infectado (EX-INF-EX) do que sem infecção (EX-EX), tanto com 7 dpi quanto com 14 dpi.



**Gráfico 21. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido hepático de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do EX-INF-EX no seu mesmo período de infecção (7 dpi ou 14 dpi). \* $p < 0,05$ .

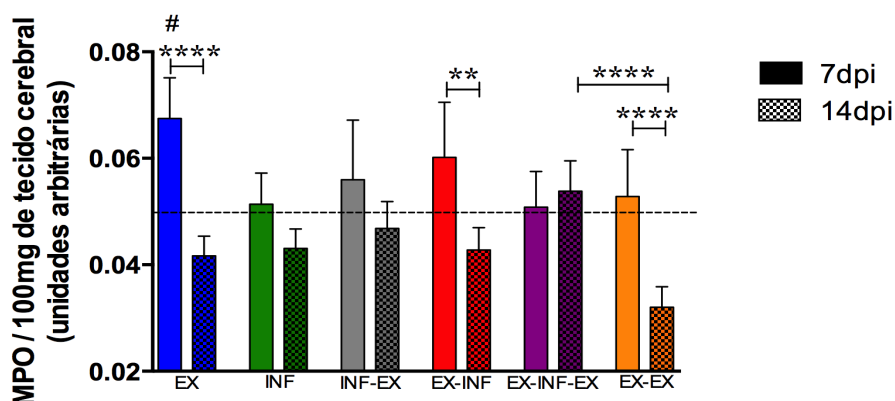


No gráfico 22 está representado a MPO por 100mg de tecido pulmonar. Com 7 dpi, o INF-EX apresentou maior valor que o INF. Com 14 dpi, o EX-INF-EX mostrou maior valor que os grupos CONTROLE e INF-EX. Os grupos exercitados por 28 dias apresentaram maiores valores quando infectado (EX-INF-EX) do que sem infecção (EX-EX), tanto com 7 dpi quanto com 14 dpi.



**Gráfico 22. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

No gráfico 23 está representado a MPO por 100mg de tecido cerebral. No 7 dpi, o grupo EX apresentou maior valor que o grupo CONTROLE, assim como quando comparado com seu respectivo grupo no 14 dpi. Os grupos EX-INF e EX-EX também apresentaram maior valor no 7 dpi quando comparado com seus respectivos grupos no 14 dpi. Com 14 dpi, o EX-INF-EX foi maior que o EX-EX.



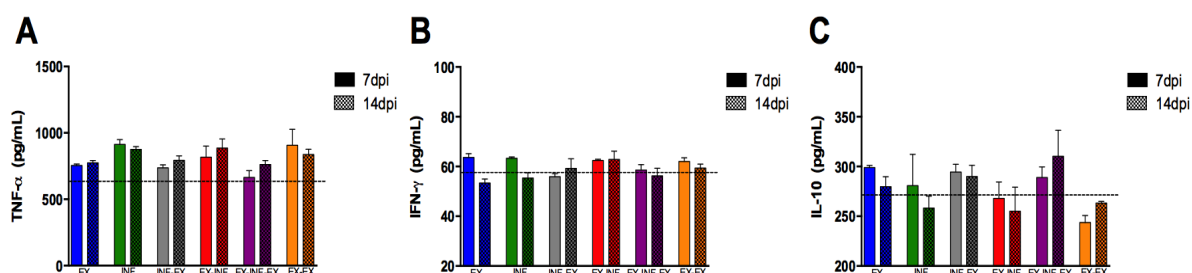
**Gráfico 23. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  desvio padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. <sup>#</sup>Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. <sup>\*\*</sup> $p < 0,01$ , <sup>\*\*\*\*</sup> $p < 0,0001$ .

## V.11. Análise da resposta inflamatória sistêmica em camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

### V.11.1. Caracterização do perfil de citocinas plasmáticas de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

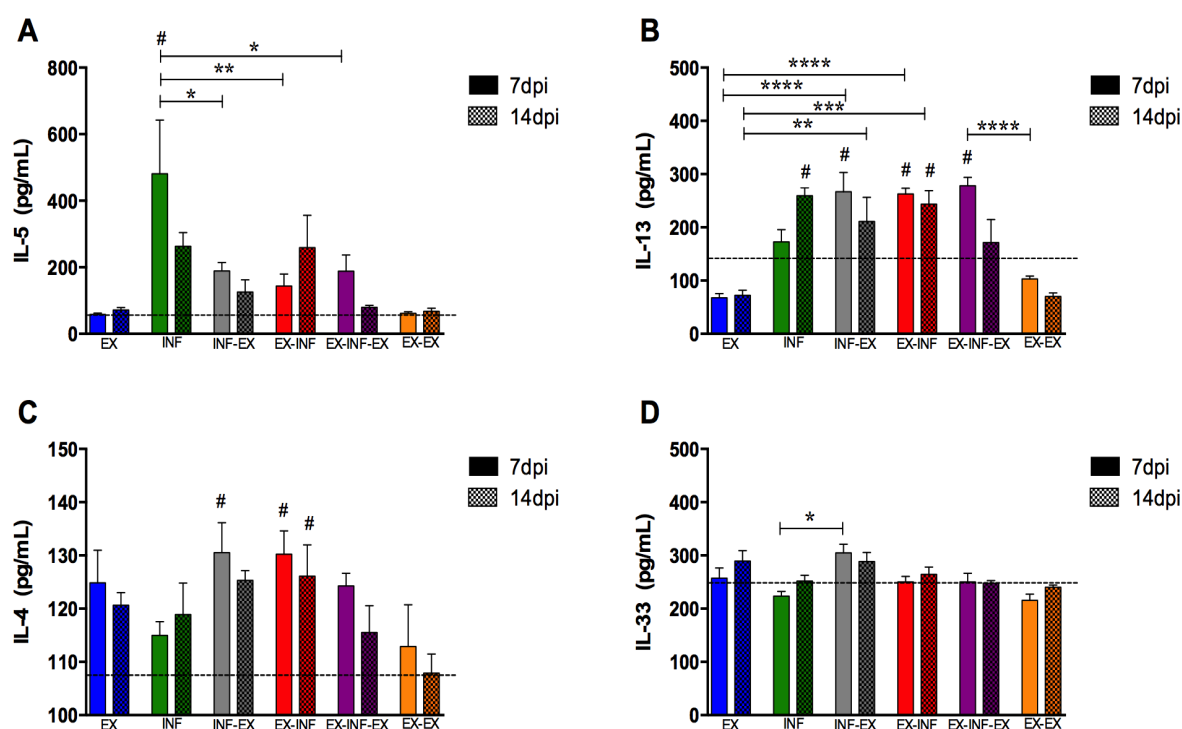
A resposta imune sistêmica dos tipos  $T_H1/T_H2$  e regulatória foi analisada pela quantificação das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos grupos experimentais e está demonstrada nos gráficos 24 e 25.

As respostas  $T_H1$  e regulatória não apresentaram diferença estatística entre grupo (Gráfico 24A, B e C).



**Gráfico 24. Níveis plasmáticos de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak.

A resposta  $T_H2$  mostrou que o grupo INF com 7 dpi apresentou maior quantidade de IL-5 quando comparado com o CONTROLE e todos os demais grupos infectados também com 7 dpi (INF, INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) (Gráfico 25A). A IL-13 no grupo EX tanto com 7 e 14 dpi apresentou em menor quantidade que os grupos INF-EX e EX-INF com o mesmo período de infecção, os quais foram maiores que o CONTROLE, assim como o grupo INF com 14 dpi e EX-INF-EX com 7dpi, sendo este com maior quantidade de IL-13 que o EX-EX com 7 dpi (Gráfico 25B). A IL-4 apresentou em maior quantidade nos grupos INF-EX e EX-INF com 7 dpi e EX-INF com 14 dpi (Gráfico 25C). A IL-33 apresentou em maior quantidade no grupo INF-EX com 7 dpi quando comparado com o grupo INF com 7 dpi (Gráfico 25D).



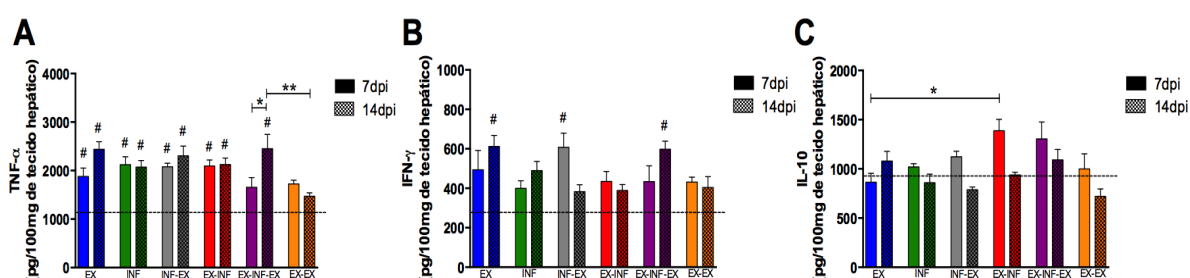
**Gráfico 25. Níveis plasmáticos de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA one way e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## V.12. Análise da resposta inflamatória tecidual em camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

Para identificar a resposta inflamatória dos tipos  $T_H1/T_H2$  e regulatória nos tecidos com a presença de larvas de *T. canis* em camundongos e o efeito modulador do protocolo de exercício físico nestes animais, foi quantificado as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral.

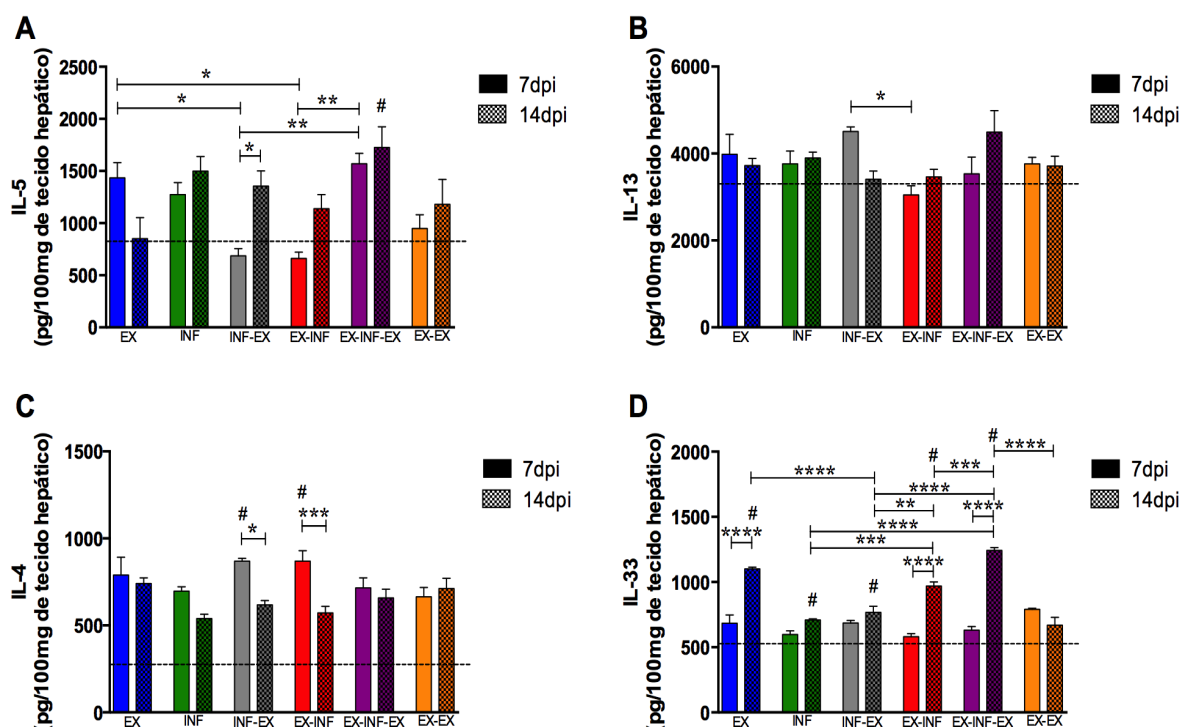
### V.12.1. Caracterização do perfil de citocinas no tecido hepático de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

As respostas  $T_H1$  e regulatória mostraram que a quantidade de TNF- $\alpha$  no fígado dos grupos experimentais foi maior nos grupos EX, INF, INF-EX e EX-INF tanto com 7 quanto com 14 dpi quando comparado com o CONTROLE, e no grupo EX-INF-EX com 14 dpi quando comparado com o seu respectivo grupo com 7 dpi, CONTROLE e EX-EX com 14 dpi (Gráfico 26A). A IFN- $\gamma$  no fígado dos grupos experimentais apresentou em maior quantidade nos grupos EX, INF-EX e EX-INF-EX com 14 dpi quando comparados com o CONTROLE (Gráfico 26B). A IL-10 apresentou em maior quantidade no grupo EX-INF 7 dpi quando comparado com o grupo EX com 7 dpi (Gráfico 26C).



**Gráfico 26. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

A resposta  $T_H2$  mostrou que a quantidade de IL-5 no fígado dos grupos experimentais foi menor no grupo INF-EX com 7 dpi quando comparado com seu respectivo grupo com 14 dpi, EX e EX-INF-EX com 7 dpi; e no grupo EX-INF com 7 dpi quando comparado com EX e EX-INF-EX com 7 dpi; porém o grupo EX-INF-EX com 14 dpi apresentou maior quantidade de IL-5 que o grupo CONTROLE (Gráfico 27A). A IL-13 no fígado dos grupos experimentais mostrou maior quantidade somente no grupo INF-EX com 7 dpi quando comparado com o grupo EX-INF também com 7 dpi (Gráfico 27B). A IL-4 no fígado dos grupos experimentais mostrou maior quantidade nos grupos INF-EX e EX-INF com 7 dpi quando comparado com seus respectivos grupos com 14 dpi e CONTROLE (Gráfico 27C). A IL-33 apresentou em maior quantidade no fígado de todos os grupos experimentais com 14 dpi quando comparado com o CONTROLE, com exceção do grupo EX-EX; o grupo INF com 14 dpi apresentou menor quantidade de IL-33 que os grupos EX-INF e EX-INF-EX com 14 dpi, os quais estes foram maiores que os seus respectivos com 7 dpi; o grupo EX-INF-EX com 14 dpi foi maior que os grupos INF-EX, EX-INF e EX-EX com 14 dpi; e o grupo INF-EX com 14 dpi foi menor que os grupos EX-INF e EX com 14 dpi, sendo este maior que o seu respectivo grupo com 7 dpi (GRÁFICO 27D).

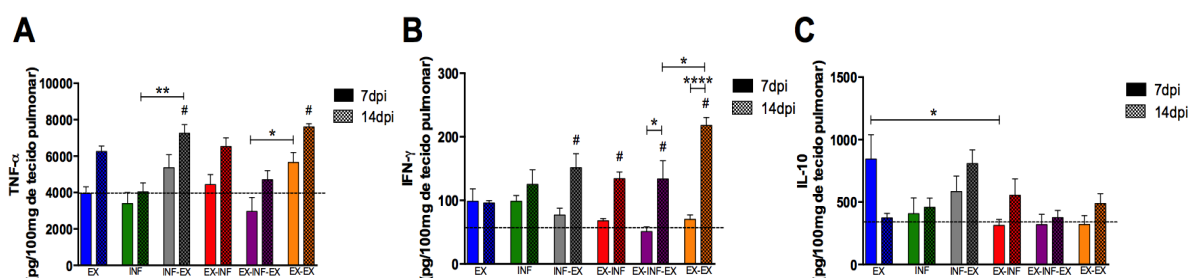


**Gráfico 27. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 no fígado de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-

EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### V.12.2. Caracterização do perfil de citocinas no tecido pulmonar de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

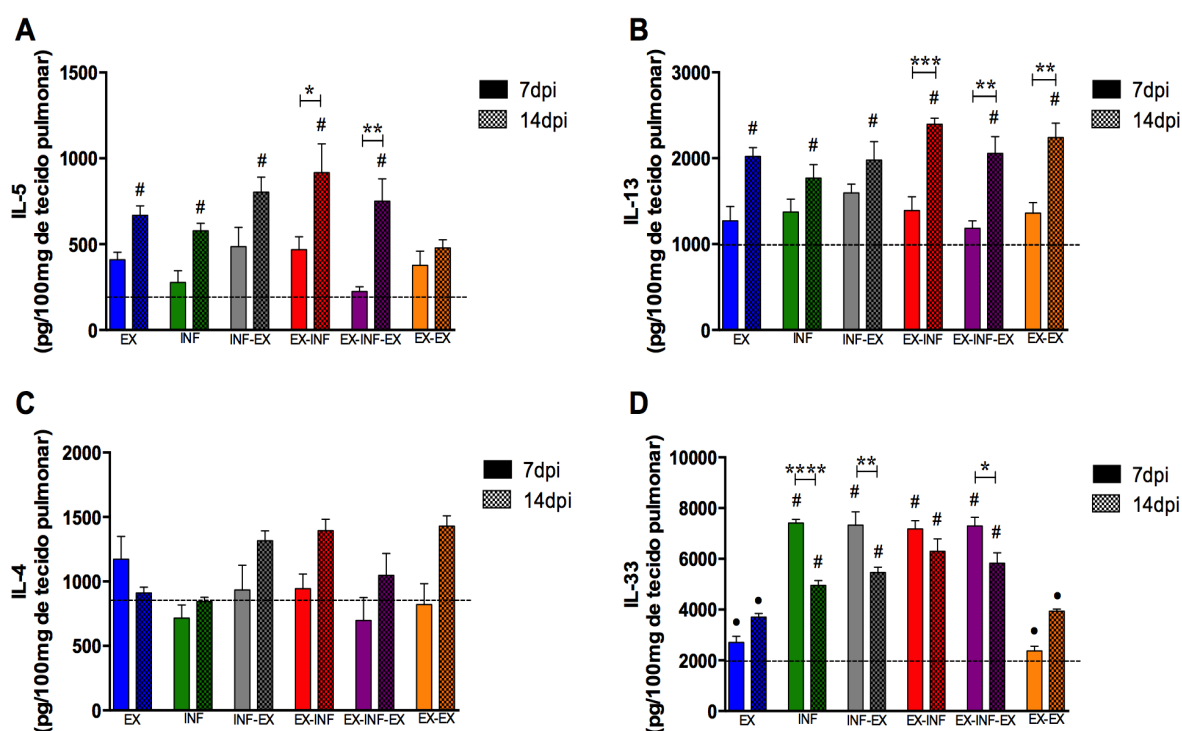
As respostas  $T_H1$  e regulatória mostraram que a quantidade de TNF- $\alpha$  nos pulmões dos grupos experimentais foi maior no grupo INF-EX com 14 dpi quando comparado com os grupos INF com 14 dpi e CONTROLE; o EX-EX 14 dpi também maior que o CONTROLE; e o EX-EX com 7 dpi foi maior que o grupo EX-INF-EX com 7 dpi (GRÁFICO 28A). A IFN- $\gamma$  nos pulmões foi maior nos grupos INF-EX, EX-INF, EX-INF-EX e EX-EX quando comparado com o CONTROLE; o grupo EX-INF-EX com 14 dpi foi maior que o seu respectivo grupo com 7 dpi e com o EX-EX com 14 dpi, sendo este maior que o seu respectivo grupo com 7 dpi (Gráfico 28B). A IL-10 mostrou maior quantidade nos pulmões somente no grupo EX com 7 dpi quando comparado com o grupo EX-INF com 7 dpi (Gráfico 28C).



**Gráfico 28. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .



A resposta  $T_H2$  mostrou que todos os grupos experimentais com 14 dpi apresentaram maiores quantidade de IL-5 nos pulmões comparados com o CONTROLE, com exceção do grupo EX-EX; e que os grupos previamente exercitado antes da infecção com 14 dpi (EX-INF e EX-INF-EX) apresentaram maiores quantidade que os seus respectivos grupos com 7 dpi (Gráfico 29A). A IL-13 também mostrou maiores quantidades em todos os grupos experimentais com 14 dpi quando comparados com o CONTROLE; e os grupos EX-INF, EX-INF-EX e EX-EX com 14 dpi apresentaram maiores quantidade que os seus respectivos grupos com 7 dpi (Gráfico 29B). A IL-4 nos pulmões dos grupos experimentais não apresentou diferença estatística (Gráfico 29C). A IL-33 mostrou maiores quantidades em todos os grupos experimentais infectados tanto com 7 quanto com 14 dpi quando comparados com o CONTROLE, sendo que os grupos INF, INF-EX e EX-INF-EX com 14 dpi apresentaram menores quantidade que os seus respectivos grupos com 7 dpi; os grupos exercitados sem infecção (EX e EX-EX) apresentaram menores quantidade de IL-33 nos pulmões que todos os demais grupos exercitados e infectados (INF-EX, EX-INF e EX-INF-EX) tanto com 7 quanto com 14 dpi (Gráfico 29D).

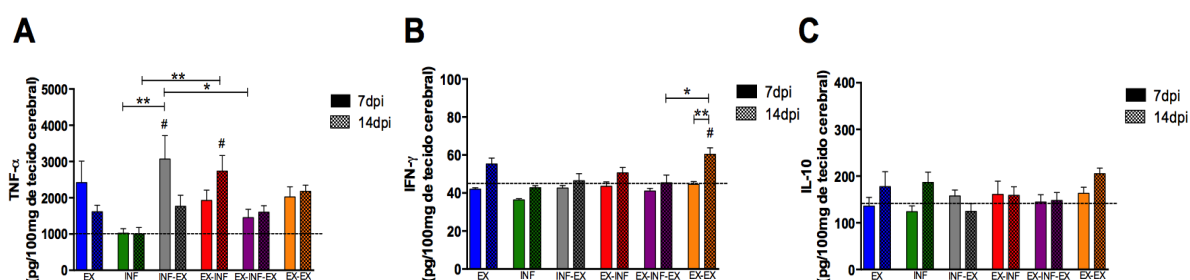


**Gráfico 29. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 nos pulmões de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-

infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. <sup>#</sup>Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. <sup>•</sup>Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) que todos os demais grupos no seu respectivo período experimental (7 ou 14 dpi). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

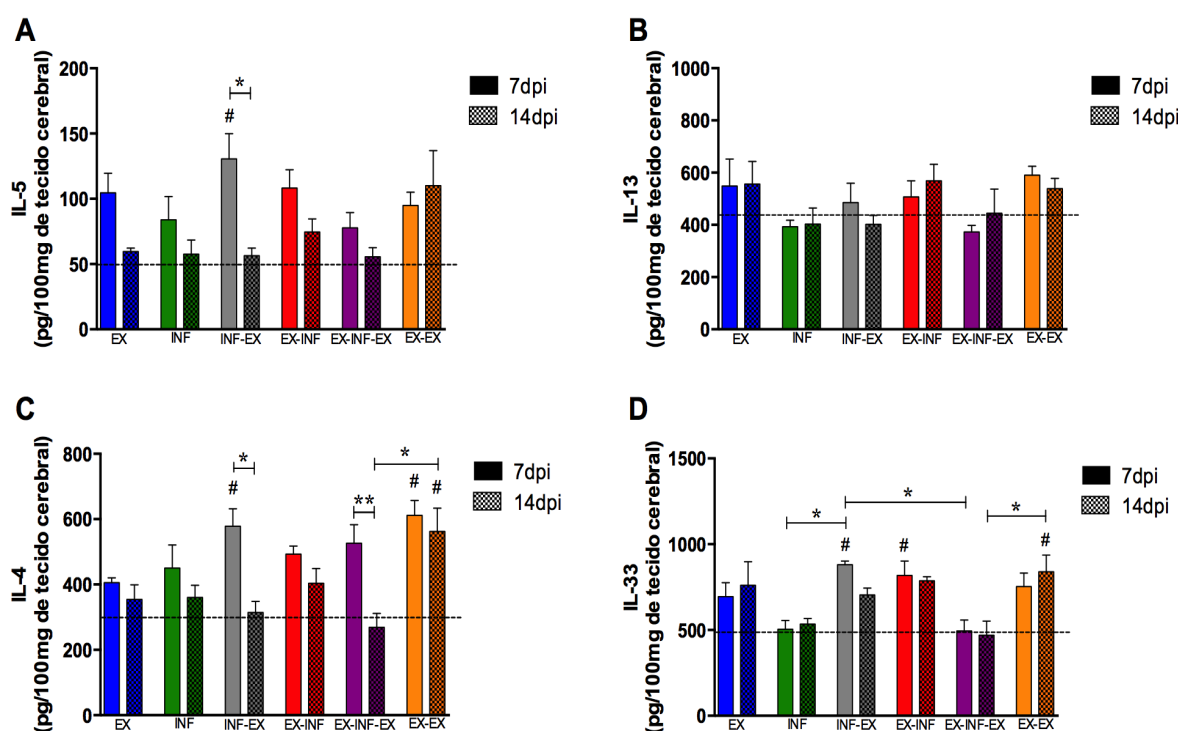
### V.12.3. Caracterização do perfil de citocinas no tecido cerebral de camundongos infectados ou não por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico

As respostas  $T_H1$  e regulatória no cérebro dos grupos experimentais mostraram maior quantidade de  $TNF-\alpha$  no grupo INF-EX com 7 dpi quando comparado com os grupos CONTROLE, INF e EX-INF-EX também com 7 dpi; e o grupo EX-INF com 14 dpi foi maior que os grupos CONTROLE e INF com 14 dpi (Gráfico 30A). A  $IFN-\gamma$  apresentou em maior quantidade no grupo exercitado por 28 dias sem infecção (EX-EX 14 dpi) quando comparado com os grupos CONTROLE, EX-INF-EX 14 dpi e com seu respectivo grupo com 7 dpi (EX-EX 7dpi) (Gráfico 30B). A IL-10 no cérebro dos grupos experimentais não apresentou diferença entre grupos (Gráfico 30C).



**Gráfico 30. Níveis de IL-10, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

A resposta  $T_H2$  mostrou que o grupo INF-EX com 7 dpi apresentou maior quantidade de IL-5 no cérebro quando comparado com o seu respectivo grupo 14 dpi e com o CONTROLE (Gráfico 31A). A IL-13 não apresentou diferença estatística (Gráfico 31B). A IL-4 estava em maior quantidade no grupo INF-EX 7 dpi quando comparado com o seu respectivo grupo 14 dpi, sendo este menor que o grupo EX-EX 14 dpi; os grupos exercitados por 28 dias sem infecção (EX-EX 7 e 14 dpi) apresentaram maior quantidade de IL-4 que o grupo CONTROLE (Gráfico 31C). A IL-33 apresentou maior quantidade no grupo INF-EX com 7 dpi quando comparado com os grupos CONTROLE, INF e EX-EX-INF também com 7 dpi; e o grupo EX-INF-EX com 14 dpi apresentou menor quantidade de IL-33 que o grupo EX-EX 14 dpi, sendo este diferente do grupo CONTROLE assim como o EX-INF com 7 dpi (Gráfico 31D).



**Gráfico 31. Níveis de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33 no cérebro de camundongos BALB/c infectados por *Toxocara canis* e submetidos ou não ao protocolo de exercício físico.** EX (n=8): exercitado sem infecção por 14 dias, INF (n=7): sedentário com infecção, INF-EX (n=6): exercitado com infecção, EX-INF (n=7): exercitado previamente e infectado sem exercício, EX-INF-EX (n=7): exercitado previamente e infectado com exercício, EX-EX (n=10): exercitado sem infecção por 28 dias, Linha pontilhada = valor médio do grupo CONTROLE (n=14), 7 dpi = 7 dias pós-infecção, 14 dpi = 14 dias pós-infecção. Dados representados em média  $\pm$  erro padrão dos grupos experimentais. Diferenças estatísticas pelo teste ANOVA *one way* e teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. #Grupo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo CONTROLE. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## **VI. DISCUSSÃO**

Para compreender as manifestações imunológicas e moleculares da infecção por *T. canis* em camundongos BALB/c, foi avaliada a recuperação de larvas em diferentes órgãos, bem como os aspectos imunopatológicos nos tecidos afetados pela migração das larvas e a resposta imune sistêmica.

A realização de estudos sobre os efeitos da migração de larvas de *Toxocara* spp. em modelos animais podem auxiliar no entendimento da toxocarose humana, visto que eles elucidam os mecanismos da interação parasito-hospedeiro (Maizels, 2013). Nesse presente estudo foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas pelo fato dessa linhagem ser suscetível a infecção por *T. canis*, apresentando a carga parasitária muito mais elevada quando comparada com outras linhagens de camundongos, principalmente na migração das larvas para o tecido cerebral, o que confirma que o camundongo BALB/c é um modelo adequado para estudos sobre LMV e NT (Strube et al., 2013).

As fezes de cães contêm os ovos não embrionado de *T. canis* que se desenvolvem em ovos infectantes sob temperatura e umidade adequados a partir de 9 a 15 dias (Schnieder et al., 2011). Em regiões com temperatura mais fria, foi notado que ovos de *T. canis* se tornaram infectantes no solo no período de 4 a 5 semanas (Zibaei et al., 2010). Nesse presente estudo utilizou-se as condições *in vitro* para o embrionamento dos ovos de *T. canis* conforme descrito para o embrionamento dos ovos de *Ascaris* spp. (Gazzinelli-Guimarães et al., 2013) e obteve-se o embrionamento dos ovos no seu estágio infectante (L3) com 4 a 6 semanas, o que sugere que este protocolo pode ser utilizado para induzir o embrionamento de ovos de nematoides.

Sobre a rota migratória das larvas de *T. canis* em hospedeiros paratênicos, Othman (2012) mostrou que há controvérsias quanto ao acúmulo de larvas de *T. canis* em diferentes órgãos durante as fases aguda e crônica da infecção em diferentes linhagem de camundongos. No seu estudo, os dados histológicos mostraram que as larvas possuíam motilidade e desta forma, ele mostrou que a migração larval é um processo contínuo e que provavelmente não é uma via de mão única, partindo da parede intestinal, através dos pulmões até o cérebro pela circulação sanguínea sistêmica.

No presente estudo com camundongos BALB/c infectados por *T. canis* mostramos que a rota migratória das larvas durante a fase inicial da infecção é do fígado (1 dpi), para os pulmões (3 dpi) e posteriormente para o cérebro (a partir do 5 dpi). Estes resultados sugerem a caracterização da rota migratória das larvas de *T. canis* em camundongos BALB/c e o surgimento de sequelas neurológicas a partir do 5 dpi. No entanto, a presença das larvas no

cérebro não exclui a presença de larvas em outros órgãos ou encistada no tecido muscular, o qual não foi analisado no nosso estudo.

O estudo de Ollero et al. (2008) analisou a influência na rota migratória de doses única e múltiplas com até 1000 ovos embrionados de *T. canis* em camundongos BALB/c com 4 semanas de idade e a produção de anticorpos. Eles mostraram que as larvas foram encontradas no cérebro também a partir do 5 dpi, independente da dose administrada. Porém a quantidade de larvas foi proporcional a quantidade de ovos embrionados administrados, comprovando o efeito dose-dependente na infecção. Eles também mostraram que a produção de anticorpos sistêmicos foi alta para IgG+IgM, IgG e IgG1, e baixa para IgG2a, IgG2b e IgG3. Estes autores explicam este fenômeno, principalmente, pela incapacidade do fígado de reter as larvas, permitindo assim a sua migração para o cérebro. A dose-dependência e a migração das larvas para o cérebro já tinha sido mostrada no estudo de Holland e Cox (2001).

Othman (2012) propõe que a tendência para acumular larvas no cérebro de camundongos infectados por *T. canis* pode ser devido a estratégia de evasão da resposta imune pelo parasito, a fim de se alocar em locais privilegiados da resposta imune por causa da barreira hemato-encefálica.

O estudo de Fan et al. (2003) mostrou que camundongos infectados por *T. canis* por mais de 67 semanas tiveram lesões inflamatórias granulomatosas no fígado, pulmões e musculatura a partir de 7 dpi com retenção das larvas a partir de 12 semanas de infecção, mas no cérebro essas lesões não foram encontradas. No nosso estudo, o tecido cerebral apresentou áreas hemorrágicas sem alterações inflamatórias.

Othman et al. (2013) mostraram alterações hepáticas em camundongos Swiss infectados por *T. canis* caracterizadas por infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos, eosinófilos e agregados de linfócitos ao redor das veias centrais e no parênquima hepático em 14 dpi. No nosso estudo, também foram encontradas alterações hepáticas devido ao infiltrado inflamatório constituído principalmente por eosinófilos e neutrófilos, sem contribuição significativa dos linfócitos, com 7 ou 14 dpi. A expressiva presença de neutrófilos confirmam que estas são as primeiras células de defesa contra a migração das larvas de *T. canis* pelos órgãos, o que também já foi proposto para protozoários (Hermosilla et al., 2014).

Othman et al. (2011 e 2013) investigaram o papel das células T<sub>REG</sub> na expressão de RNAm de Foxp3 no fígado de camundongos Swiss infectados com 1000 ovos de *T. canis*, os quais mostraram alterações vasculares, infiltrado inflamatório com formação de granuloma, alterações inflamatórias nos hepatócitos e pontos de necrose a partir de 14 dpi.

Pinelli et al. (2005 e 2007) avaliaram o efeito da dose-dependência da infecção por *T. canis* em camundongos, na produção de anticorpos, histopatologia dos pulmões e na expressão de citocinas. Eles mostraram que a infecção com 100 ou 1000 ovos embrionados causaram uma moderada infiltração perivascular e uma leve inflamação peribronquiolar nos pulmões, consistindo principalmente de eosinófilos e linfócitos, e uma alveolite com a presença de grandes macrófagos e hemorragia, a partir do 7 até 60 dpi. No nosso estudo, a histopatologia dos pulmões demonstrou lesões com infiltrado inflamatório com a presença de eosinófilos, linfócitos e macrófagos, com 7 dpi persistindo com 14 dpi.

O estudo de Othman et al. (2010) com camundongos Swiss infectados por *T. canis* mostrou larvas móveis no tecido cerebral, criando túneis com o seu deslocamento. No nosso estudo, a histopatologia do cérebro mostrou a presença de larvas de *T. canis* sem retenção das mesmas por reação inflamatória, porém devido a motilidade das larvas foi identificado congestão vascular e hemorragias.

Kolbeková et al. (2011a e 2011b) avaliaram a rota migratória de 1000 larvas de *T. canis* marcados com carboxifluoresceína succinimidil éster em camundongos BALB/c por um sistema de imagens e mostrou a presença de larvas no intestino nas primeiras 12 horas de infecção, pico de larvas no fígado com 1 dpi, nos pulmões a partir de 60 horas e no cérebro a partir de 6 dpi. Porém, eles não analisaram o intervalo de infecção de 60 horas até 6 dpi. Eles mostraram que na reinfecção as larvas estavam presentes nesses tecidos já no 1 dpi. Os resultados histopatológicos mostraram hiperemia no fígado com larvas cercadas com infiltrado inflamatório irregular com predominância de granulócitos e pontos de necrose, os pulmões foram diagnosticados com pneumonia purulenta e o cérebro não apresentou reação inflamatória em torno das larvas. Os nossos resultados apresentaram resultados histopatológicos semelhantes.

Vários modelos animais estão sendo testados para o estudo de modelos apropriados para a toxocarose, como o hamster. No estudo de Da Silva et al. (2014), hamsters infectados com 750 ovos embrionados de *T. canis* apresentaram a histopatologia do fígado com infiltrado inflamatório irregular e dos pulmões com pneumonia intersticial com 15 dpi. Os nossos resultados foram similares a esses achados, entretanto utilizamos camundongos BALB/c infectados com 14 dpi.

No nosso estudo, a secreção de citocinas no sangue periférico na infecção por *T. canis* em camundongos BALB/c foi avaliada a fim de corroborar com os resultados da recuperação das larvas e histopatologia. A infecção por *T. canis* elucida as respostas  $T_H1/T_H2$  com predominância da segunda, na qual a formação de granuloma é devido as células efetoras da



resposta  $T_H1$ , e os elevados níveis de IgE e eosinofilia são predominantemente mediados pela resposta  $T_H2$  (Fan et al., 2013). No nosso estudo avaliamos a fase inicial da infecção por *T. canis* e não encontramos granulomas nos tecidos analisados. Porém foi identificada a neutrofilia e eosinofilia no sangue e nos cortes histológicos, que coincidem com o aumento das citocinas  $T_H2$ , tais como IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, a partir do 3 dpi.

Hamilton et al. (2008) avaliaram a resposta imune no cérebro de camundongos BALB/c e NIH infectados com 2000 ovos embrionados de *T. canis* e observaram aumento na expressão de iNOS (óxido nítrico induzível), IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  no tecido cerebral a partir de 3 dpi persistindo até 97 dpi, sendo este aumento mais pronunciado no BALB/c. Moreira-Silva et al. (2004) reportaram eosinofilia no líquido cefalorraquidiano de pacientes com suspeita de neurotoxocarose, desta forma, um dos papéis efetores da IL-5 é provocar infiltrado eosinofílico no cérebro.

No nosso estudo identificamos que os camundongos infectados por *T. canis* tiveram uma significativa leucocitose sistêmica com predominância de neutrófilos até 7 dpi, indicando uma resposta inflamatória aguda. Com 14 dpi, a eosinofilia foi predominante, confirmando seu papel na defesa das infecção helmínticas. Pecinali et al. (2005) identificaram a leucocitose com prevalência de neutrófilos desde o 1 dpi, corroborando com nossos achados.

Takamoto et al. (1998) demonstraram que camundongos infectados por *Toxocara* spp. tiveram um aumento bifásico na eosinofilia durante a infecção. Eles utilizaram camundongos com deficiência de células CD4 e mostraram que o aumento da eosinofilia nos primeiros 10 dpi é devido a resposta imune inata, e a eosinofilia após 3 semanas de infecção é dependente de células T CD4, a qual faz parte da resposta imune adaptativa. No presente estudo, identificou-se eosinofilia com 7 e 14 dpi, a qual ocorreu pela resposta imune inata contra a infecção. A neutrofilia foi identificada no início da infecção persistindo até 7 dpi, as quais parecem desempenhar um papel importante durante a resposta inata contra o helminto, como mostrado no estudo de Hermosilla et al. (2014).

Na imunopatologia da infecção por *Toxocara* spp. as citocinas desempenham um importante papel na definição do tipo de resposta imunológica. As respostas do tipo  $T_H1$  e  $T_H17$  produzem citocinas pró-inflamatórias e mediam a inflamação pela secreção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17. As células  $T_H2$  produzem citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33, e contribuem para a sobrevivência do parasito (Raphael et al., 2014). O estudo de Pinelli et al. (2007) avaliou o quantidade de RNAm de IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  no tecido pulmonar e observaram que os animais infectados com 1000 ovos embrionados de *T. canis* tiveram aumento de IL-4 a partir de 14 dpi; aumento de IL-5 e IL-10 a partir de 7 dpi; e não

apresentaram mudanças nos níveis de IFN- $\gamma$ , o que caracteriza a predominância da resposta  $T_H2$ . Pecinali et al. (2005) analisaram o tecido pulmonar de BALB/c infectado com 1000 ovos embrionados de *T. canis* por 45 dpi, mostrando que a migração das larvas desencadeia aumentos de IL-6 e IFN- $\gamma$  no lavado broquialveolar (BAL) e no plasma a partir de 4 dpi. No nosso estudo, as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-17, mostraram aumento durante os primeiros 3 dias de infecção, porém com 7 e 14 dpi os níveis de IL-6 diminuíram e IL-17 aumentaram.

A IL-6 é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias que atua na produção de células imunocompetentes e hematopoiéticas, causando a sua proliferação e diferenciação. Ela é produzida por vários tipos de células, tais como células T, B, monócitos, macrófagos, células dendríticas, endoteliais, gliais e fibroblastos (Ohsugi, 2007). Além disso, em conjunto com o TGF- $\beta$ , a IL-6 estimula as células da resposta imune inata pelos mecanismos efetores de células T e promove o desenvolvimento de células  $T_H17$  (Veldhoen et al., 2006). A IL-6 desempenha um papel chave no desenvolvimento das células CD4  $T_H17$ , e juntas (IL-6 e IL-17) se regulam para conduzir o processo inflamatório crônico da doença (Harrington et al., 2006). Bashir et al. (2015) relataram inibição de liberação de IL-17 por um aumento nos níveis de IL-4 e IL-10 em infecções helmínticas. Eles demonstraram que este mecanismo acontece porque a IL-10 por si só não é capaz de regular negativamente a expressão de IL-17, necessitando da ajuda da IL-4, que bloqueia a produção de IL-17, embora não completamente. No nosso estudo, o aumento da produção de IL-4 sem contribuição de IL-10 não reduziu a IL-17 em camundongos infectados por *T. canis*, e isto pode estar associado com a resposta inflamatória tecidual nos pulmões e fígado.

O estudo de Pinelli et al. (2007) mostrou aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10 nos pulmões com 7 e 14 dpi, usando a técnica de PCR. O nosso estudo mostrou esse mesmo perfil de secreção das citocinas antiinflamatórias, porém sem aumento da IL-10 plasmática nos camundongos infectados por *T. canis*. Isto sugere a produção dessa citocina regulatória apenas no local da infecção.

Os helmintos podem promover um fenótipo de regulação das resposta imunológicas pela secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ . A IL-10 é uma citocina que estimula as células  $T_{REG}$  que suprimem a excreção das células  $T_H1$  e  $T_H17$ . O papel das células  $T_{REG}$  em doenças helmínticas pode determinar se a doença está na fase aguda ou crônica da infecção (Spencer et al., 2009). Alcântara-Neves et al. (2014) investigaram como as coinfeções por *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Toxocara* spp. afetam os marcadores da resposta alérgica e da asma em crianças. Eles observaram uma associação entre as coinfeções por helmintos e

uma alta produção de IL-10 proporcional a carga parasitária das infecções, assim como uma elevada resposta de citocinas  $T_H2$ , principalmente de IL-5. No nosso estudo foi identificado níveis elevados de IL-5, durante a fase inicial da infecção, no entanto, com 14 dpi teve diminuição de IL-5 e aumento de IL-10. Isto poderia sugerir a mudança de infecção aguda para crônica.

Sutherland et al. (2014) demonstraram que em camundongos BALB/c infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*, as proteínas quitinase-like (CLPs) induzem a ativação de neutrófilos em conjunto com a IL-17 produzida pelas células  $LT\gamma\delta$  ativadas, as quais contribuem para a eliminação de larvas, porém promovem maiores lesões teciduais durante a migração larval. Porém, os nematoides podem suprimir a liberação de IL-17 na resposta imune, conforme foi mostrado no estudo de Gaze et al. (2012). O estudo de Chen et al. (2012) demonstrou que na tentativa de diminuir a lesão tecidual, a resposta  $T_H1$  muda para  $T_H2$  a partir do 4 dpi por helmintos. No nosso estudo, encontramos uma resposta imune com níveis elevados de citocina  $T_H2$  no sangue periférico a partir do 3 dpi, sem contribuição de IFN- $\gamma$ .

Na fase inicial da infecção por helmintos, as citocinas IL-5, IL-13 e IL-33 podem desempenhar um papel protetor para a saúde no hospedeiro acidental (Finlay et al., 2014). A IL-33 é uma citocina de alarme contra os repetidos danos causados na parede intestinal pelos helmintos (Allen e Maizels, 2011). Porém, no nosso estudo, os níveis de IL-13 e IL-33 não foram expressivos na resposta imune contra *T. canis*.

A avaliação do efeito do exercício físico de intensidade moderada em camundongos BALB/c infectados por *T. canis* teve como importância principal a compreensão do reconhecimento imunológico e evasão do parasito nesta condição metabólica. Nesse presente estudo, o desenvolvimento corporal dos animais submetidos ou não ao protocolo de exercício físico e infectados ou não por *T. canis* foi avaliado pela mensuração do peso corporal e comprimento nasoanal. Durante a fase inicial da infecção, não foram observadas alterações no desenvolvimento corporal dos animais.

A natação é uma habilidade natural dos murinos, a qual vem sendo utilizada em pesquisas com animais para evitar algum tipo de estresse desnecessário ao protocolo experimental (Kim et al., 2013). No nosso estudo, a intensidade do esforço físico na natação foi avaliada pela concentração de lactato sanguíneo e comprovou que foi realizado o exercício com intensidade moderada (Kudaeva et al., 2012), pois a concentração de lactato plasmático de aproximadamente 4 mmol/L em murinos representa a transição nas vias metabólicas para a produção de energia do metabolismo aeróbio para anaeróbio na prática do exercício físico, no qual o animal pode ser mantido nessa intensidade por um longo período de tempo sem causar

fadiga (Gobatto et al., 2011; Mader e Heck, 1986). Essa transição se refere ao equilíbrio entre a produção e remoção de lactato durante a realização do exercício (Almeida et al., 2011).

O estudo de Jones e Cartes (2000) mostrou que o treinamento aeróbico, como a corrida e natação, provoca adaptações nos sistemas pulmonar, cardiovascular e neuromuscular que melhoram o fornecimento de oxigênio a partir do ar atmosférico para as mitocôndrias e melhorar o controle do metabolismo nas células musculares, consequentemente melhora no desempenho da habilidade motora. Esse controle do metabolismo nas células musculares sugere a estabilização do lactato sanguíneo em animais treinados. No nosso estudo, os animais treinados por 28 dias mostraram menor capacidade de produção de lactato e/ou maior capacidade de remoção lactato para a mesma carga de treino, sugerindo a adaptação metabólica ao treinamento físico de natação.

O estudo de Kudaeva et al. (2012) avaliou o exercício físico regular de intensidade moderada pela natação durante 4 meses em camundongos e verificou que a prática de exercício estimulou a hematopoiese pela estimulação da mielopoiese na medula óssea e células eritroides nucleadas do baço, o que levou a produção de hemoglobina em resposta as condições de aumento da demanda de oxigênio para os músculos exercitados. No nosso estudo, os animais dos grupos que treinaram por 28 dias também apresentaram aumento de hemoglobina provocada pela adaptação ao exercício físico.

Sobre o efeito do exercício na migração das larvas de *T. canis*, os tecidos hepáticos e pulmonares não apresentaram diferenças. Porém os grupos que permaneceram no treinamento físico durante a infecção tiveram uma menor quantidade de larvas migrando para o cérebro. O tecido cerebral foi identificado como o local preferido pelas larvas de *Toxocara* spp. por Janecek et al. (2014).

O infiltrado inflamatório encontrado no tecido hepático pela presença das larvas de *T. canis* foi menor em todos os grupos exercitados com 14 dpi. O estudo de Chen et al. (2007) avaliou em ratos o efeito do exercício físico regular e moderado por corrida na esteira por 8 semanas antes da administração de lipopolissacarídeo (LPS) via artéria femoral, para avaliar seus efeitos no choque séptico. Os resultados mostraram que o exercício físico promoveu um efeito protetor na inflamação e necrose nos tecidos cardíacos, hepáticos e pulmonares. Porém não foram demonstrados os mecanismos protetores do exercício para esses tecidos.

No estudo de Da Cunha et al. (2014) foi avaliado o dano tecidual causado após 24 horas da instilação intratraqueal de LPS em ratos submetidos por 60 dias ao treinamento moderado em esteira, para avaliar a insuficiência respiratória, inflamação e edema pulmonar. Os resultados mostram que o exercício impediu totalmente a formação do edema pulmonar e

consequentemente diminuição da inflamação, porém não evitou o comprometimento mecânico da insuficiência respiratória. No nosso estudo, a inflamação nos pulmões causado pela infecção por *T. canis* foi menor nos animais previamente treinados.

Van de Weert-van Leeuwen et al. (2013) avaliaram o efeito do exercício voluntário na roda de corrida por 4 semanas em camundongos BALB/c com infecção bacteriana pulmonar. Os resultados mostraram que os grupos que possuíam a roda de corrida na gaiola tiveram uma acentuada inflamação pulmonar. Eles sugerem cautela a prática de exercício físico concomitante a infecção bacteriana pulmonar. No nosso estudo, o grupo que realizou o exercício físico concomitante a infecção por *T. canis* apresentou área de lesão pulmonar semelhante ao grupo sedentário infectado.

O exercício físico pode induzir alterações na quantidade de leucócitos no sangue, o qual pode ser explicado pela mobilização das células a partir de danos musculares. Porém o efeito crônico do exercício físico parece não alterar a quantidade de leucócitos, especialmente de neutrófilos (Krüger e Mooren, 2007). No nosso estudo, todos os animais treinados apresentaram uma neutrofilia com 7 dpi persistindo com 14 dpi. O estudo de Gleeson e Bishop (2005) mostrou uma diminuição de neutrófilos no sangue em pessoas com condições inflamatórias crônicas que praticaram exercício físico. Todavia, esses estudos mostram que os mecanismos de imunossupressão causados pelo exercício físico envolvendo elementos do sistema imune dependem de vários fatores e ainda permanecem obscuros. Desta forma, sugere-se que o aumento de neutrófilos no sangue periférico e MPO nos tecidos hepáticos e pulmonares foram causados pela inflamação em resposta ao parasito, sendo estas células a primeira linha de defesa contra os patógenos (Pecinali et al., 2005). A eosinofilia foi evidente somente nos grupos infectados, confirmando o papel dos eosinófilos para a eliminação do parasito o que foi apoiada pela presença de EPO nos tecidos hepáticos e pulmonares (Takamoto et al., 1998).

O estudo de Mota et al. (2012) avaliou o efeito crônico do exercício moderado na esteira em ratos Wistar com traumatismo crânio-encefálico (TCE). Os resultados mostraram os efeitos do exercício físico foram favoráveis na reabilitação neurológica, pois evitaram o comprometimento da função motora pela lesão cerebral, pelo aumento de IL-10 e diminuição de IL-1, TNF- $\alpha$  e MPO no tecido cerebral. Esses resultados sugeriram efeito profilático do exercício ao TCE em humanos. No nosso estudo, a quantidade de MPO no tecido cerebral foi diminuída com 14 dpi no grupo previamente exercitado.

O perfil de citocinas plasmáticas mostraram que o exercício físico diminuiu IL-5 e aumentou IL-4 e IL-13 nos grupos exercitados e infectado, porém sem contribuição da IL-10.

O estudo de Da Silva et al. (2014) avaliaram o efeito no exercício físico moderado em esteira antes e após a indução de inflamações alérgicas das vias aéreas superiores em BALB/c. Os resultados mostraram que o condicionamento físico pode modificar o equilíbrio da resposta  $T_H1/T_H2$  reduzindo a expressão de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, o que não foi visto no estudo de Silva et al. (2010). Porém o condicionamento físico proporcionou aumento de IL-10, proporcionando a minimização da reação alérgica por essa citocina.

Nos tecidos hepático, pulmonar e cerebral, o exercício físico proporcionou aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em animais infectado ou não por *T. canis*. A resposta  $T_H2$  nos tecidos hepático e cerebral foram mediadas pela IL-4, IL-5 e IL-33 e no tecido pulmonar pela IL-5, IL-13 e IL-33. Esse padrão de citocinas é estimulado pela liberação de IL-6 e cortisol durante o exercício físico na ativação do HHA (Bergmann et al., 1999). Entretanto os mecanismos modulares potenciais das respostas  $T_H1/T_H2$  nos tecidos ainda são limitados (Berger, 2000).

O estudo de Starzak et al. (2015) sobre as respostas imunológicas e inflamatórias em atletas de diferentes etnias mostrou que existe discrepância da resposta imunológica bem como predisposição para certas doenças metabólicas em diferentes grupos étnicos. Nesse estudo foi investigado os níveis de citocinas sistêmicas, IL-4, IL-6, IL-10, IL-1RA, IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-7, IL-8 e TNF- $\alpha$ , e mostrou que os corredores africanos apresentaram elevados níveis dessas citocinas quando comparados com os caucasianos, em teste de corrida em esteira. Isto indicou que a etnia pode desempenhar um papel na resposta imunológica e inflamatória induzida pelo exercício. Em modelo animal, o estudo de Su et al. (2001) avaliou diferentes respostas imunológicas frente as variadas intensidade de exercício físico em diferentes linhagens de camundongos. Nesse estudo, o efeito do exercício físico na resposta imunológica mostrou aumentar a capacidade fagocitária e antitumoral pela citotoxicidade dos macrófagos peritoniais, porém C57BL/6 ativa a resposta fagocítica pelos M1 presentes no BAL, enquanto o BALB/c responde pelo M2. Como M1 e M2 são intrinsecamente diferentes e usam estratégias distintas para regular a sua própria função, parece ser interessante analisar o mecanismo de imunorregulação em diferentes linhagens. Esses estudos demonstram que ainda são muitas as lacunas sobre os efeitos do exercício físico no sistema imunológico.

## **VII. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

Neste estudo, a otimização da padronização da infecção experimental por *T. canis* em camundongos apresentou uma resposta pró-inflamatória sistêmica, com a ativação de células efetoras da resposta imune inata e resposta imune  $T_H2$  dominante nas mudanças histopatológicas nos tecidos invadidos pelas larvas durante a fase inicial da infecção. Assim, conclui-se que esses achados podem contribuir para uma melhor compreensão dos eventos imunopatológicos que podem ocorrer durante a toxocarose humana. Essa compreensão mostra como o *T. canis* é capaz de modular os mecanismos efetores da resposta imunológica do hospedeiro acidental, o que justifica a introdução de iniciativas nacionais de controle para essa doença, a qual ainda é negligenciada.

Os efeitos do exercício físico moderado nesse modelo experimental proporcionaram melhora na capacidade do organismo à tolerar de forma mais adequada os danos causados pelos eventos inflamatórios da infecção por *T. canis*. Assim, conclui-se que o sistema imunológico nessa condição patológica foi potencializado pelo condicionamento físico dos animais em um padrão de resposta mista  $T_H1/T_H2$ . Desta forma, a prática de exercícios físicos pode influenciar na melhor qualidade de vida de pessoas com toxocarose, os quais foram mostrados pelo aprimoramento da tolerância ao desgaste físico na adaptação ao exercício físico, caracterizados pela liberação de citocinas antiinflamatórias que minimizam os danos causados pela infecção por *T. canis*.

As perspectivas para novos estudos são para entender como o exercício físico afeta os vários componentes do sistema imunológico em diferentes linhagens de modelo experimental animal, visto a discrepância dos seus mecanismos imunológicos em resposta a prática do exercício físico.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alcântara-Neves NM, de S G Britto G, Veiga RV, Figueiredo CA, Fiaccone RL, da Conceição JS, Cruz AA, Rodrigues LC, Cooper PJ, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes*. 2014;7:817.

Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):375-88.

Almeida WS, Lima LC, Cunha VN, R Cunha R, Araújo RC, Barros CC, Simões HG, Campbell CS. Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice. *Cell Biochem Funct*. 2011;29(8):666-72.

Amaral HL, Rassier GL, Pepe MS, Gallina T, Villela MM, Nobre Mde O, Scaini CJ, Berne ME. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for Visceral Larva Migrants. *Vet Parasitol*. 2010;174(1-2):115-8.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):975-87.

Avcioğlu H, Soykan E, Tarakci U. Control of helminth contamination of raw vegetables by washing. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(2):189-91.

Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitol Res*. 2012;110(2):649-56.

Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*. 2005;78(2):352-8.

Barry MA, Bezek S, Serpa JA, Hotez PJ, Woc-Colburn L. Neglected infections of poverty in Texas and the rest of the United States: management and treatment options. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(2):170-81.

Bashi T, Bizzaro G, Ben-Ami Shor D, Blank M, Shoenfeld Y. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2015;14(2):98-104.

Bass JL, Mehta KA, Glickman LT, Eppes BM. Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. *N Engl J Med*. 1983;308(12):723-4.

Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrants; report of three cases. *Pediatrics*. 1952;9(1):7-19.

Berger A. Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. 2000;321(7258):424.

Bergmann M, Gornikiewicz A, Sautner T, Waldmann E, Weber T, Mittlböck M, Roth E, Függer R. Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock*. 1999;12(6):421-7.

Berner B, Wolf G, Hummel KM, Müller GA, Reuss-Borst MA. Increased expression of CD40 ligand (CD154) on CD4+ T cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000;59(3):190-5.

Blazius RD, Emerick S, Prophiro JS, Romão PR, Silva OS. [Occurrence of protozoa and helminthes in faecal samples of stray dogs from Itapema City, Santa Catarina]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(1):73-4.

Boes J, Medley GF, Eriksen L, Roepstorff A, Nansen P. Distribution of *Ascaris suum* in experimentally and naturally infected pigs and comparison with *Ascaris lumbricoides* infections in humans. *Parasitology*. 1998;117 (Pt 6):589-96.

Buijs J, Borsboom G, Renting M, Hilgersom WJ, van Wieringen JC, Jansen G, Neijens J. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J*. 1997;10(7):1467-75.

Bustinduy AL, Thomas CL, Fiutem JJ, Parraga IM, Mungai PL, Muchiri EM, Mutuku F, Kitron U, King CH. Measuring fitness of Kenyan children with polyparasitic infections using the 20-meter shuttle run test as a morbidity metric. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(7):e1213.

Caldera F, Burlone ME, Genchi C, Pirisi M, Bartoli E. *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection*. 2013;41(3):691-4.

Caliari MV, Lana M, Leite VH, Tafuri WL. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol*. 1995;76(4):299-307.

Calvert J, Burney P. *Ascaris*, atopy, and exercise-induced bronchoconstriction in rural and urban South African children. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(1):100-5.e1-5.

Cardillo N, Rosa A, Ribicich M, López C, Sommerfelt I. Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB/c mice, migratory behaviour and pathological changes. *Zoonoses Public Health*. 2009;56(4):198-205.

Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*. 2004;29(1):18-24.

Carswell F, Meakins RH, Harland PS. Parasites and asthma in Tanzanian children. *Lancet*. 1976 Oct 2;2(7988):706-7.

Carvalho EAA, Rocha RL. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. *J Pediatr (Rio J)*. 2011;87(2):100-10.

Carvalho EAA, Rocha RL. Visceral Larva Migrans Syndromes Associated with Toxocariasis: Epidemiology, Clinical and Laboratory Aspects of Human Toxocariasis. *Curr Trop Med Rep*. 2014;1:74-79.

Cassenote AJ, Lima AR, Pinto Neto JM, Rubinsky-Elefant G. Seroprevalence and modifiable risk factors for *Toxocara* spp. in Brazilian schoolchildren. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2830.

Cassenote AJ, Pinto Neto JM, Lima-Catelani AR, Ferreira AW. [Soil contamination by eggs of soil-transmitted helminths with zoonotic potential in the town of Fernandópolis, State of São Paulo, Brazil, between 2007 and 2008]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(3):371-4.

Cdc.org. [Página da internet]. Toxocariasis: Biology [revisado 2015]. Disponível: <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/biology.html>.

Chen F, Liu Z, Wu W, Rozo C, Bowdridge S, Millman A, Van Rooijen N, Urban JF Jr, Wynn TA, Gause WC. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med*. 2012;18(2):260-6.

Chen HI, Hsieh SY, Yang FL, Hsu YH, Lin CC. Exercise training attenuates septic responses in conscious rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(3):435-42.

Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, Wang CR, Zhu XQ. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect Genet Evol*. 2012;12(7):1344-8.

Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML, Lescano SA. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51(6):301-8.

Choi D, Lim JH, Choi DC, Lee KS, Paik SW, Kim SH, Choi YH, Huh S. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: a cross-sectional study in healthy adults. *Korean J Parasitol*. 2012;50(1):23-7.

Colli CM, Rubinsky-Elefant G, Paludo ML, Falavigna DL, Guilherme EV, Mattia S, Araújo SM, Ferreira EC, Previdelli IT, Falavigna-Guilherme AL. Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of South Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(2):69-74.

Collins PD, Marleau S, Griffiths-Johnson DA, Jose PJ, Williams TJ. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med*. 1995;182(4):1169-74.

Cooper PJ, Barreto ML, Rodrigues LC. Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. *Br Med Bull*. 2006;79-80:203-18.

Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*. 2007;14(4):329-34.

Da Cunha MJ, da Cunha AA, Scherer EB, Machado FR, Loureiro SO, Jaenisch RB, Guma F, Lago PD, Wyse AT. Experimental lung injury promotes alterations in energy metabolism and respiratory mechanics in the lungs of rats: prevention by exercise. *Mol Cell Biochem*. 2014;389(1-2):229-38.

Da Silva AM, Chieffi PP, da Silva WL, Kanashiro EH, Rubinsky-Elefant G, Cunha-Neto E, Mairena EC, De Brito T. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model of toxocariasis: histopathological, immunohistochemical, and immunoelectron microscopic findings. *Parasitol Res*. 2014 Dec 19.

Da Silva RA, Almeida FM, Olivo CR, Saraiva-Romanholo BM, Perini A, Martins MA, Carvalho CR. Comparison of the effects of Aerobic Conditioning Before and After Pulmonary Allergic Inflammation. *Inflammation*. 2014 Dec 24.

Damian MM, Martins M, Sardinha JF, Souza LO, Chaves A, Tavares Ade M. [Frequency of the antibody anti-*Toxocara canis* in a community along the Uatumã river, State of Amazonas]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(6):661-4.

Dattoli VC, Freire SM, Mendonça LR, Santos PC, Meyer R, Alcantara-Neves NM. *Toxocara canis* infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. *Trop Med Int Health*. 2011;16(4):514-7.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(1):37-49.

Deslandes A, Moraes H, Ferreira C, Veiga H, Silveira H, Mouta R, Pompeu FA, Coutinho ES, Laks J. Exercise and mental health: many reasons to move. *Neuropsychobiology*. 2009;59(4):191-8.

Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(2):265-72.

Dutra GF, Pinto NS, de Avila LF, Dutra PC, Telmo Pde L, Rodrigues LH, Silva AM, Scaini CJ. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol*. 2014;203(1-2):87-90.

Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;966:290-303.

Elewaut D, Ware CF. The unconventional role of LT alpha beta in T cell differentiation. *Trends Immunol.* 2007;28(4):169-75.

Elliott DE, Weinstock JV. Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1247:83-96.

Endara P, Vaca M, Chico ME, Erazo S, Oviedo G, Quinzo I, Rodriguez A, Lovato R, Moncayo AL, Barreto ML, Rodrigues LC, Cooper PJ. Long-term periodic anthelmintic treatments are associated with increased allergen skin reactivity. *Clin Exp Allergy.* 2010;40(11):1669-77.

Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(12):1751-9.

Evengård B. Schistosomiasis. Immunological, serological and clinical aspects. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1989;63:1-72.

Fan CK, Liao CW, Cheng YC. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: genetics and environment. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):342-52.

Fan CK, Lin YH, Du WY, Su KE. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol.* 2003;113(2):145-55.

Feldman GJ, Parker HW. Visceral larva migrans associated with the hypereosinophilic syndrome and the onset of severe asthma. *Ann Intern Med.* 1992;116(10):838-40.

Ferreira JC, Rolim NP, Bartholomeu JB, Gobatto CA, Kokubun E, Brum PC. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007b;34(8):760-5.

Ferreira MU, Rubinsky-Elefant G, de Castro TG, Hoffmann EH, da Silva-Nunes M, Cardoso MA, Muniz PT. Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: a population-based cross-sectional study. *J Trop Pediatr.* 2007a;53(2):119-24.

Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):327-36.

Fiore M, Carere C, Moroni R, Aloe L. Passive avoidance response in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Physiol Behav.* 2002;75(4):449-54.

Fisher M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol.* 2003;19(4):167-70.

Flohr C, Tuyen LN, Quinnell RJ, Lewis S, Minh TT, Campbell J, Simmons C, Telford G, Brown A, Hien TT, Farrar J, Williams H, Pritchard DI, Britton J. Reduced helminth burden increases allergen skin sensitization but not clinical allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial in Vietnam. *Clin Exp Allergy*. 2010;40(1):131-42.

Fragoso RP, Monteiro MB, Lemos EM, Pereira FE. Anti-Toxocara antibodies detected in children attending elementary school in Vitoria, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(4):461-6.

Fragoso RP. Estudo de prevalência e incidência de reação sorológica positiva para toxocara em crianças matriculadas na primeira série do ensino fundamental público no município de Vitória-ES. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Biomédico. 2006.

Gavignet B, Piarroux R, Aubin F, Millon L, Humbert P. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(6):1031-42.

Gaze S, Bethony JM, Periago MV. Immunology of experimental and natural human hookworm infection. *Parasite Immunol*. 2014;36(8):358-66.

Gaze S, McSorley HJ, Daveson J, Jones D, Bethony JM, Oliveira LM, Speare R, McCarthy JS, Engwerda CR, Croese J, Loukas A. Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002520.

Gazzinelli-Guimarães PH, Gazzinelli-Guimarães AC, Silva FN, Mati VL, Dhomm-Lemos L de C, Barbosa FS, Passos LS, Gaze S, Carneiro CM, Bartholomeu DC, Bueno LL, Fujiwara RT. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int J Parasitol*. 2013;43(9):697-706.

Geiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Carvalho OS, Corrêa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasite Immunol*. 2002;24(11-12):499-509.

Giacomin PR, Cava M, Tumes DJ, Gauld AD, Iddawela DR, McColl SR, Parsons JC, Gordon DL, Dent LA. *Toxocara canis* larval excretory/secretory proteins impair eosinophil-dependent resistance of mice to *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasite Immunol*. 2008;30(8):435-45.

Gideononline.com [Página da internet]. Toxocariasis: Global Status [revisado 2015]. Disponível: <http://www.gideononline.com/ebooks/country/infectious-diseases-of-the-world>.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):607-15.

Gleeson M, Bishop NC. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant*. 2005;10(4):43-8.

Gleeson M, Pyne DB. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise effects on mucosal immunity. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(5):536-44.

Glickman LT, Magnaval JF, Domanski LM, Shofer FS, Lauria SS, Gottstein B, Brochier B. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am J Epidemiol*. 1987;125(6):1019-34.

Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev*. 1981;3:230-50.

Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2001;130(1):21-7.

Gommerman JL, Browning JL, Ware CF. The Lymphotoxin Network: orchestrating a type I interferon response to optimize adaptive immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(2):139-45.

Grama DF, Lescano SZ, Pereira Mota KC, dos Anjos Pultz B, Miranda JS, Silva Segundo GR, Taketomi EA, Fernandes KP, Limongi JE, de Paula FM, Chieffi PP, Cury MC. Seroprevalence of *Toxocara* spp. in children with atopy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(12):797-803.

Guerra D. Medical and Scientific Illustration in Veterinary Medicine & Zoology. Disponível: <http://www.diogoguerra.com/albums/parasitology/content/morphology-of-different-stages-of-toxocara-spp/>

Hagel I, Cabrera M, Hurtado MA, Sanchez P, Puccio F, Di Prisco MC, Palenque M. Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyper reactivity: an outstanding association in Venezuelan school children from endemic areas. *Acta Trop*. 2007;103(3):231-41.

Hamilton CM, Brandes S, Holland CV, Pinelli E. Cytokine expression in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. *Parasite Immunol*. 2008;30(3):181-5.

Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(3):349-56.



Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, Macera CA, Heath GW, Thompson PD, Bauman A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(8):1423-34.

Helmby H. Helminths and our immune system: friend or foe? *Parasitol Int.* 2009;58(2):121-7.

Hermosilla C, Caro TM, Silva LM, Ruiz A, Taubert A. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology.* 2014;141(11):1489-98.

Heukelbach J, Frank R, Ariza L, de Sousa Lopes I, de Assis E Silva A, Borges AC, Limongi JE, de Alencar CH, Klimpel S. High prevalence of intestinal infections and ectoparasites in dogs, Minas Gerais State (southeast Brazil). *Parasitol Res.* 2012;111(5):1913-21.

Holland CV, Cox DM. *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? *J Helminthol.* 2001;75(2):125-35.

Hotez PJ, Wilkins PP. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(3):e400.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1831-5.

Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasit Vectors.* 2014;7:194.

Japyassú FA, Mendes AA, Bandeira AP, Oliveira FR, Sobral Filho D. Hemodynamic profile of severity at pulmonary vasoreactivity test in schistosomiasis patients. *Arq Bras Cardiol.* 2012;99(3):789-796.

Jones AM, Carter H. The effect of endurance training on parameters of aerobic fitness. *Sports Med.* 2000;29(6):373-86.

Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 2003;171(12):6323-7.

Katagiri S, Oliveira-Sequeira TC. Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Exp Parasitol.* 2010;126(2):214-6.

Kazacos KR, Kazacos EA, Render JA, Thacker HL. Cerebrospinal nematodiasis and visceral larva migrans in an Australian (Latham's) brush turkey. *J Am Vet Med Assoc*. 1982;181(11):1295-8.

Kazacos KR. Visceral and ocular larva migrans. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1991 Aug;6(3):227-35.

Keegan JD, Holland CV. A comparison of *Toxocara canis* embryonation under controlled conditions in soil and hair. *J Helminthol*. 2013;87(1):78-84.

Keegan JD, Holland CV. Contamination of the hair of owned dogs with the eggs of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol*. 2010;173(1-2):161-4.

Kim HJ, Kim IK, Song W, Lee J, Park S. The synergic effect of regular exercise and resveratrol on kainate-induced oxidative stress and seizure activity in mice. *Neurochem Res*. 2013;38(1):117-22.

Kolbeková P, Kolářová L, Větvička D, Syrůček M. Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. *Parasitol Res*. 2011a;108(4):1007-14.

Kolbeková P, Větvička D, Svoboda J, Skírnisson K, Leissová M, Syrůček M, Marečková H, Kolářová L. *Toxocara canis* larvae reinfesting BALB/c mice exhibit accelerated speed of migration to the host CNS. *Parasitol Res*. 2011b;109(5):1267-78.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485-517.

Krüger K, Mooren FC. T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2007;13:37-54.

Kudaeva OT, Kolesnikova OP, Sukhenko TG, Kozlov VA. Effect of regular physical training on hemopoiesis in experimental animals. *Bull Exp Biol Med*. 2012;153(2):217-21.

Kuperman DA, Huang X, Koth LL, Chang GH, Dolganov GM, Zhu Z, Elias JA, Sheppard D, Erle DJ. Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat Med*. 2002;8(8):885-9.

Lee AC, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends Parasitol*. 2010;26(4):155-61.

Licona-Limón P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol*. 2013;14(6):536-42.

Logar J, Kraut A, Likar M. *Toxocara* antibodies in patients with visceral or ocular disorder in Slovenia. *Infection*. 1993;21(1):27-9.

Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-84.

ma

Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol*. 2013;43(12-13):999-1008.

Mader A, Heck H. A theory of the metabolic origin of "anaerobic threshold". *Int J Sports Med*. 1986;7 Suppl 1:45-65.

Magnaaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 2001;39(1):1-11.

Magnaaval JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;88(5):531-3.

Magnaaval JF. Apparent weak efficacy of ivermectin for treatment of human toxocariasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(10):2770.

Maizels RM, Hewitson JP, Smith KA. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr Opin Immunol*. 2012 Aug;24(4):459-66.

Maizels RM, Smith KA. Regulatory T cells in infection. *Adv Immunol*. 2011;112:73-136.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):733-44.

Maizels RM. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):365-74.

Malbec O, Daéron M. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev*. 2007;217:206-21.

Manini MP, Marchioro AA, Colli CM, Nishi L, Falavigna-Guilherme AL. Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. *Vet Parasitol*. 2012;188(1-2):48-52.

Marchioro AA, Colli CM, Ferreira EC, Tiyo R, Mattia S, de Souza WF, Falavigna-Guilherme AL. Identification of public areas with potential toxocariasis transmission risk using geographical information systems. *Acta Parasitol*. 2013;58(3):328-33.

Marques JP, Guimarães Cde R, Boas AV, Carnaúba PU, Moraes Jd. Contamination of public parks and squares from Guarulhos (São Paulo State, Brazil ) by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(5):267-71.

Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)*. 2005;4(2):73-89.

Mattia S, Colli CM, Adami CM, Guilherme GF, Nishi L, Rubinsky-Elefant G, Marchioro AA, Gomes ML, Falavigna-Guilherme AL. Seroprevalence of Toxocara infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. *J Helminthol*. 2012;86(4):440-5.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-44.

Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 2008;63(11):1455-63.

Mendonça LR, Veiga RV, Dattoli VC, Figueiredo CA, Fiaccone R, Santos J, Cruz AA, Rodrigues LC, Cooper PJ, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML, Alcantara-Neves NM. Toxocara seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1886.

Merluzzi S, Betto E, Ceccaroni AA, Magris R, Giunta M, Mion F. Mast cells, basophils and B cell connection network. *Mol Immunol*. 2015;63(1):94-103.

Mikhael NZ, Montpetit VJ, Orizaga M, Rowsell HC, Richard MT. Toxocara canis infestation with encephalitis. *Can J Neurol Sci*. 1974;1(2):114-20.

Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8(1):22.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8. ed. Rev. Brasília: Ministério da Saúde. 2010;444 p.

Moga AM, de Marchie M, Saey D, Spahija J. Mechanisms of non-pharmacologic adjunct therapies used during exercise in COPD. *Respir Med*. 2012;106(5):614-26.

Moreira GM, Telmo Pde L, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ, Conceição FR. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol*. 2014;30(9):456-64.

Moreira-Silva SF, Rodrigues MG, Pimenta JL, Gomes CP, Freire LH, Pereira FE. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37(2):169-74.

Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LF, Magni DV, Ferreira AP, Oliveira MS, Furian AF, Mazzardo-Martins L, Silva MD, Santos AR, Ferreira J, Figuera MR, Royes LF. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotox Res*. 2012;21(2):175-84.

Muradian V, Gennari SM, Glickman LT, Pinheiro SR. Epidemiological aspects of Visceral Larva Migrans in children living at São Remo Community, São Paulo (SP), Brazil. *Vet Parasitol.* 2005;134(1-2):93-7.

Nagao F, Suzui M, Takeda K, Yagita H, Okumura K. Mobilization of NK cells by exercise: downmodulation of adhesion molecules on NK cells by catecholamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):R1251-6.

NCBI taxonomy database 2013. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6265>

Nicoletti A. Toxocariasis. *Handb Clin Neurol.* 2013;114:217-28.

Nieman DC, Bishop NC. Nutritional strategies to counter stress to the immune system in athletes, with special reference to football. *J Sports Sci.* 2006;24(7):763-72.

Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med.* 1999;27(2):73-80.

Nieman DC. Exercise and resistance to infection. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998;76(5):573-80.

Noh Y, Hong ST, Yun JY, Park HK, Oh JH, Kim YE, Jeon BS. Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *J Korean Med Sci.* 2012;27(9):1105-8.

Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1997;39(5):253-6.

Obwaller A, Jensen-Jarolim E, Auer H, Huber A, Kraft D, Aspöck H. *Toxocara* infestations in humans: symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti-IgE immune complexes. *Parasite Immunol.* 1998;20(7):311-7.

Oge H, Oge S, Ozbakış G, Gürçan S. Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol.* 2014;206(3-4):227-231.

Ohsugi Y. Recent advances in immunopathophysiology of interleukin-6: an innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interleukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of immune-mediated inflammatory diseases. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(11):2001-6.

Oliart-Guzmán H, Delfino BM, Martins AC, Mantovani SA, Braña AM, Pereira TM, Branco FL, Ramalho AA, Campos RG, Fontoura PS, de Araujo TS, de Oliveira CS, Muniz PT, Rubinsky-Elefant G, Codeço CT, da Silva-Nunes M. Epidemiology and control of child

toxocariasis in the western Brazilian Amazon – a population-based study. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90(4):670-81

Ollero MD, Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL, Del Aguila C. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop.* 2008;105(2):124-30.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 1990. Disponível: <http://whqlibdoc.who.int/hq/1990/31595.pdf>

Ortega E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev.* 2003;9:70-93.

Othman AA, Abdel-Aleem GA, Saied EM, Mayah WW, Elatrash AM. Biochemical and immunopathological changes in experimental neurotoxocariasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2010;172(1):1-8.

Othman AA, Ashour DS, Mohamed DA. Toxocara-induced hepatic inflammation: immunohistochemical characterization of lymphocyte subpopulations and Bcl-2 expression. *Exp Parasitol.* 2013;134(1):76-81.

Othman AA, El-Shourbagy SH, Soliman RH. Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Exp Parasitol.* 2011;127(2):454-9.

Othman AA. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind? *Acta Trop.* 2012;124(3):171-8.

Overgaauw PA, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):398-403.

Overgaauw PA. Aspects of *Toxocara* epidemiology: human toxocarosis. *Crit Rev Microbiol.* 1997;23(3):215-31.

Paludo ML, Falavigna DL, Elefant GR, Gomes ML, Baggio ML, Amadei LB, Falavigna-Guilherme AL. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, south Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49(6):343-8.

Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 2001;75(4):299-305.

Pawłowski ZS, Mizgajska H. [Toxocariasis in Poznan region, Poland, in years 1990-2000]. *Przegl Epidemiol.* 2002;56(4):559-65.

Pecinali NR, Gomes RN, Amendoeira FC, Bastos AC, Martins MJ, Pegado CS, Bastos OM, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet Parasitol.* 2005;134(1-2):121-30.

Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(8):457-65.

Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(4):152-6.

Pedersen BK, Edward F. Adolph distinguished lecture: muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(4):1006-14.

Peixoto PL, Nascimento E, Cançado GG, Miranda RR, Rocha RL, Araújo RN, Fujiwara RT. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(2):200-6.

Perzanowski MS, Ng'ang'a LW, Carter MC, Odhiambo J, Ngari P, Vaughan JW, Chapman MD, Kennedy MW, Platts-Mills TA. Atopy, asthma, and antibodies to *Ascaris* among rural and urban children in Kenya. *J Pediatr*. 2002;140(5):582-8.

Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(4):1154-62.

Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Fonville M, Hamilton CM, der Giessen Jv. *Toxocara canis*: effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Exp Parasitol*. 2007;115(1):76-82.

Pinelli E, Withagen C, Fonville M, Verlaan A, Dormans J, van Loveren H, Nicoll G, Maizels RM, van der Giessen J. Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(6):826-32.

Prestes-Carneiro LE, Santarém V, Zago SC, Miguel NA, Zambelli Sde F, Villas R, Vaz AJ, Rubinsky-Elefant G. Sero-epidemiology of toxocariasis in a rural settlement in São Paulo state, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2008;102(4):347-56.

Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1283:67-74.

Quattrocchi G, Nicoletti A, Marin B, Bruno E, Druet-Cabanac M, Preux PM. Toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1775.

Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2014;pii: S1043-4666(14)00539-0.

Regis SC, Mendonça LR, Silva Ndos S, Dattoli VC, Alcântara-Neves NM, Barrouin-Melo SM. Seroprevalence and risk factors for canine toxocariasis by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazil. *Acta Trop*. 2011;120(1-2):46-51.

Resende NM, de Magalhães Neto AM, Bachini F, de Castro LE, Bassini A, Cameron LC. Metabolic changes during a field experiment in a world-class windsurfing athlete: a trial with multivariate analyses. *OMICS*. 2011;15(10):695-704.

Rocha S, Pinto RM, Floriano AP, Teixeira LH, Bassili B, Martinez A, Costa SO, Caseiro MM. Environmental analyses of the parasitic profile found in the sandy soil from the Santos municipality beaches, SP, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(5):277-81.

Rodrigues-Machado M da G, Silva GC, Pinheiro MB, Caliarí MV, Borges EL. Effects of sepsis-induced acute lung injury on glycogen content in different tissues. *Exp Lung Res*. 2010;36(5):302-6.

Rubinsky-Elefant G, da Silva-Nunes M, Malafronte RS, Muniz PT, Ferreira MU. Human toxocariasis in rural Brazilian Amazonia: seroprevalence, risk factors, and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(1):93-8.

Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104(1):3-23.

Saenz SA, Taylor BC, Artis D. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunol Rev*. 2008;226:172-90.

Santarém VA, Franco Eda C, Kozuki FT, Fini D, Prestes-Carneiro LE. Environmental contamination by *Toxocara* spp. eggs in a rural settlement in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008;50(5):279-81.

Santarém VA, Leli FN, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Protective and risk factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011;53(2):66-72.

Santarém VA, Pereira VC, Alegre BC. Contamination of public parks in Presidente Prudente (São Paulo, Brazil) by *Toxocara* spp. eggs. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(3):323-5.

Schantz PM. *Toxocara larva migrans* now. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;41(3 Suppl):21-34.

Schneider R, Obwaller A, Auer H. Immunoblot for the detection of *Ascaris suum*-specific antibodies in patients with visceral larva migrans (VLM) syndrome. *Parasitol Res*. 2015;114(1):305-10.

Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol*. 2011;175(3-4):193-206.



Schoenardie ER, Scaini CJ, Avila LF, Sperotto RL, Borsuk S, Felicetti CD, Pepe M, Berne ME. Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2014;23(3):403-6.

Schoenardie ER, Scaini CJ, Brod CS, Pepe MS, Villela MM, McBride AJ, Borsuk S, Berne ME. Serodiagnosis of visceral larva migrans in children of south of brazil. *J Parasitol*. 2012 Dec 5.

Schoenardie ER, Scaini CJ, Pepe MS, Borsuk S, de Avila LF, Villela M, Berne ME. Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2013;22(4):623-6.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75(2):163-89.

Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, Martins MA, Carvalho CR. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J*. 2010;35(5):994-1002.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa A Jr, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transiente airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infect Immun*. 2002;70(11):6263-72.

Skurkovich S, Skurkovich B. Anticytokine therapy, especially anti-interferon-gamma, as a pathogenetic treatment in TH-1 autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1051:684-700.

Slentz CA, Aiken LB, Houmard JA, Bales CW, Johnson JL, Tanner CJ, Duscha BD, Kraus WE. Inactivity, exercise, and visceral fat. STRRIDE: a randomized, controlled study of exercise intensity and amount. *J Appl Physiol*. 2005;99(4):1613-8.

Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol*. 2009;25(4):182-8.

Smith PM, Jacque B, Conner JR, Poltorak A, Stadecker MJ. IRAK-2 regulates IL-1-mediated pathogenic Th17 cell development in helminthic infection. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002272.

Spencer LA, Szela CT, Perez SA, Kirchhoffer CL, Neves JS, Radke AL, Weller PF. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. *J Leukoc Biol*. 2009;85(1):117-23.

Sprenger LK, Green KT, Molento MB. Geohelminth contamination of public áreas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(1):69-73.

Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production in humans. *FASEB J.* 2003;17(8):884-6.

Starzak DE, Semple SJ, Smith L, Mckune A. Differing cytokine responses by ethnic groups to a bout of exercise-induced muscle damage: A preliminary report. *J Sports Med Phys Fitness.* 2015 Feb 18.

Stevens W, Addo-Yobo E, Roper J, Woodcock A, James H, Platts-Mills T, Custovic A. Differences in both prevalence and titre of specific immunoglobulin E among children with asthma in affluent and poor communities within a large town in Ghana. *Clin Exp Allergy.* 2011;41(11):1587-94.

Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):375-89.

Su SH, Chen H, Jen CJ. C57BL/6 and BALB/c bronchoalveolar macrophages respond differently to exercise. *J Immunol.* 2001;167(9):5084-91.

Sutherland TE, Logan N, Rückerl D, Humbles AA, Allan SM, Papayannopoulos V, Stockinger B, Maizels RM, Allen JE. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. *Nat Immunol.* 2014;15(12):1116-25.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 1990;145(11):3796-806.

Takamoto M, Wang ZX, Watanabe N, Matsuzawa A, Nariuchi H, Sugane K. Eosinophilia, IgE production, and cytokine production by lung T cells in surface CD4-deficient mutant mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology.* 1998;95(1):97-104.

Teixeira CR, Chieffi PP, Lescano SA, de Melo Silva EO, Fux B, Cury MC. Frequency and risk factors for toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2006;48(5):251-5.

Turrientes MC, Perez de Ayala A, Norman F, Navarro M, Perez-Molina JA, Rodriquez-Ferrer M, Garate T, Lopez-Velez R. Visceral larva migrans in immigrants from latin america. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(7):1263-5.

van de Weert-van Leeuwen PB, de Vrankrijker AM, Fentz J, Ciofu O, Wojtaszewski JF, Arets HG, Hulzebos HJ, van der Ent CK, Beekman JM, Johansen HK. Effect of long-term

voluntary exercise wheel running on susceptibility to bacterial pulmonary infections in a mouse model. *PLoS One*. 2013;8(12):e82869.

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(23):13427-31.

van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med*. 2008;10(2):128-40.

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.

Volpato GT, Damasceno DC, Kempinas WG, Rudge MV, Calderon IM. Effect of exercise on the reproductive outcome and fetal development of diabetic rats. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(6):852-8.

Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Trop*. 2008;106(2):90-5.

Wilder HC. Nematode endophthalmitis. *Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol*. 1950;55:99-104.

Woods JA. Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med*. 2000;21 Suppl 1:S24-30.

Yap P, Du ZW, Chen R, Zhang LP, Wu FW, Wang J, Wang XZ, Zhou H, Zhou XN, Utzinger J, Steinmann P. Soil-transmitted helminth infections and physical fitness in school-aged Bulang children in southwest China: results from a cross-sectional survey. *Parasit Vectors*. 2012;16(5):50.

Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:405-29.

Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Oujii Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int*. 2008;57(4):525-9.

Zibaei M, Abdollahpour F, Birjandi M, Firoozeh F. Soil contamination with *Toxocara* spp. eggs in the public parks from three areas of Khorram Abad, Iran. *Nepal Med Coll J*. 2010;12(2):63-5.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

---

### Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

#### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 181 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Efeitos do exercício físico em camundongos infectados com *Toxocara canis*", que tem como responsável Ricardo Toshio Fujiwara, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 17/09/2013. Este certificado espira-se em 17/09/2018.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**Artigo submetido no Parasites & Vectors**

**New insights into the immunopathology of early  
*Toxocara canis* infection in mice**

Nathália M Resende<sup>1,2</sup>, Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães<sup>1</sup>, Fernando S Barbosa<sup>1</sup>,  
Luciana M Oliveira<sup>1</sup>, Denise S Nogueira<sup>1</sup>, Ana Clara Gazzinelli-Guimarães<sup>1</sup>, Marco  
Túlio P Gonçalves<sup>1</sup>, Chiara CO Amorim<sup>1</sup>, Fabrício MS Oliveira<sup>3</sup>, Marcelo V Caliarí<sup>3</sup>,  
Milene A Rachid<sup>3</sup>, Gustavo T Volpato<sup>2</sup>, Lilian L Bueno<sup>1</sup>, Stefan M Geiger<sup>1</sup>, Ricardo  
T Fujiwara<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva, Instituto de  
Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do  
Garças, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal  
de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

<sup>§</sup>Corresponding author: Ricardo Toshio Fujiwara, PhD  
Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites,  
Sector E4, Room 167, Department of Parasitology Institute of Biological Sciences,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil  
(e-mail: fujiwara@icb.ufmg.br)

Email addresses:

NMR: [nathy\\_resende@yahoo.com.br](mailto:nathy_resende@yahoo.com.br)  
PHGG: [pedrogazzinelli@yahoo.com.br](mailto:pedrogazzinelli@yahoo.com.br)  
FSB: [fernandosergioba@gmail.com](mailto:fernandosergioba@gmail.com)  
LMO: [luliz\\_maria@yahoo.com.br](mailto:luliz_maria@yahoo.com.br)  
DSN: [denisesnogueira@gmail.com](mailto:denisesnogueira@gmail.com)  
ACGG: [aninhaguimaraes2@hotmail.com](mailto:aninhaguimaraes2@hotmail.com)  
MTPG: [marcotpg8@hotmail.com](mailto:marcotpg8@hotmail.com)  
CCOA: [chiaramorim@hotmail.com](mailto:chiaramorim@hotmail.com)  
FMSO: [fabriciom19@yahoo.com.br](mailto:fabriciom19@yahoo.com.br)  
MVC: [caliari@icb.ufmg.br](mailto:caliari@icb.ufmg.br)  
MAR: [milenerachid@icb.ufmg.br](mailto:milenerachid@icb.ufmg.br)  
GTV: [gtvolpato@yahoo.com](mailto:gtvolpato@yahoo.com)  
LLB: [lilianlacerdabueno@hotmail.com](mailto:lilianlacerdabueno@hotmail.com)  
SMG: [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)  
RTF: [fujiwara@icb.ufmg.br](mailto:fujiwara@icb.ufmg.br)

# Abstract

## Background

Nematodes of the genus *Toxocara* are frequent cosmopolitan roundworms of dogs and cats. Accidentally, *Toxocara* spp. can infect humans and cause a zoonosis called human toxocariasis, which is characterized by a visceral, ocular or cerebral migration of larval stages of the parasite, without completing its life cycle. In general, chronic nematode infections induce a polarized T<sub>H</sub>2 immune response. However, during the initial phase of infection, strong pro-inflammatory response is part of the immunological profile and might determine the outcome and/or pathology of the infection.

## Methods

The purpose of this experimental study was to evaluate parasitological aspects of the migratory route and histopathology during larval migration, as well as, innate immune responses and systemic cytokine patterns at different time points of early *T. canis* infection in BALB/c mice, which were inoculated via intra-gastric route with a single dose of 1000 fully embryonated eggs.

## Results

The most important findings were that *T. canis* induced a mix of innate inflammatory/T<sub>H</sub>17/T<sub>H</sub>2 response during the early infection, with the predominance of the last one. The T<sub>H</sub>2 response was evidenced by significant increase of cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33, besides of increasing levels of IL-6 and IL-17 during early infection. No significant increases were observed for IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  levels. In parallel, the parasitological analysis revealed clearly the pattern of larval migration through the mice organs, starting from the liver in the first 24 hours of infection, reaching the peak in the lungs on the 3<sup>rd</sup> day of infection and finally,



being found numerously in the brain after 5 days of infection. Peripheral leukocytosis, characterized by an early neutrophilia and subsequent eosinophilia were remarkable during the early infection in mice. The tissue damage induced by larvae was evidenced by the histopathological analysis of all organs at different time points of infection. The larvae migration induced an intense inflammation and hemorrhage in liver and lungs and hemorrhagic necrosis in brain of infected animals.

### **Conclusion**

In conclusion, these new insights into early *T. canis* infection in mice presented here enable a better understanding of the immunopathological events that also may occur during human toxocariasis, thus contributing for future strategies of diagnosis and control.

### **Keywords**

*Toxocara canis*, immunopathology, murine model, cytokines, inflammation

## Background

Toxocariasis is caused by ingestion of fully embryonated eggs or ingestion of infective larvae together with paratenic hosts of the nematode roundworms *Toxocara canis* (Werner 1782) or *Toxocara cati* (Schränk 1788). These species are cosmopolitan and zoonotic parasites of dogs and cats, respectively. Human toxocariasis, characterized by a visceral larvae migration, is considered an important public health problem in the tropics and sub-tropics nations where pet treatment and population control is limited<sup>1</sup>. This scenario is aggravated by precarious sanitation in these environments or by deficiencies in diagnosis and antihelminthic treatment of pets, thus exposing humans to these parasites<sup>2</sup>.

Due to the increasing number of dogs and cats being kept as pets worldwide, *T. canis* and *T. cati* infections are the main cause of human toxocariasis<sup>3</sup>. Oge et al<sup>4</sup> reported that worldwide prevalences vary from 3% to 82% for *T. canis* in dogs and 8% to 91% for *T. cati* in cats. The differential diagnosis between *T. canis* and *T. cati* infections by serological surveys is still challenging<sup>5</sup> due to the large number of common antigenic fractions. However, there is no difference in the zoonotic potential of both parasite species and they show a comparable behavior in paratenic hosts<sup>6</sup>.

Human toxocariasis can be asymptomatic or show clinical syndromes, caused by the migration of *Toxocara* spp. larvae through the bloodstream and internal organs, depending on the intensity of infection and the immune response of the host<sup>1</sup>. Depending on the affected organ and the clinical symptoms, toxocariasis can be classified as visceral larva migrans (VLM) or visceral toxocariasis (VT) and ocular larva migrans (OLM) or ocular toxocariasis (OT), covert or common toxocariasis (CT) and neurotoxocariasis (NT)<sup>7</sup>. Different studies have characterized human toxocariasis as a chronic infection that can persist for several years<sup>8,9,10</sup>.

Helminth infection induce a polarized T<sub>H</sub>2 response, which secretes IL-4, IL-5 and IL-13, involved in the activation of mast cells, eosinophils, and macrophages and result in the secretion of high levels of IgE. Besides that, triggering a T<sub>H</sub>2 response normally coincides with a downmodulation of the T<sub>H</sub>1 inflammatory response, reducing the expression of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and IL-17<sup>11,12</sup>. However, helminth parasites are able to evade the host immune system, e.g. by the activation of regulatory T cells that induce a production of downregulating cytokines, such as IL-10 and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )<sup>13,14</sup>. On the other hand, the immune system needs to orchestrate a careful balance between pro, anti-inflammatory and regulatory responses in order to function efficiently against *Toxocara* spp. infection.

Experimental *T. canis* infections in mice revealed an elevated eosinophilia with high titers of IgE, 60 days after infection<sup>15</sup>. In addition, high IL-6 and IFN- $\gamma$  plasmatic levels correlated with pulmonary lesions<sup>16</sup> and in chronic *T. canis* infections a predominance of T<sub>H</sub>2 immune response was reported<sup>17</sup>. However, it still remains unclear when and how the systemic T<sub>H</sub>1 response switches to the dominant T<sub>H</sub>2 immune response or coexist with it. Thus, the purpose of this study was to evaluate the migratory route and histopathology of parasitized tissues and correlate them with innate immune responses and systemic cytokines profiles during early *T. canis* infection in mice.

## Methods

### Parasite

*Toxocara canis* adult worms were obtained from feces of naturally infected dogs, which were kept at the Zoonosis Control Center (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). At this center, dogs were routinely treated with anthelmintics (Top-Dog,

Ourofino®) and mature *Toxocara* parasites were collected after elimination in fecal samples. Parasites were maintained in saline solution until being processed at the Laboratory of Immunology and Genomics of Parasites at the Federal University of Minas Gerais, Brazil.

The purification of *T. canis* eggs was performed as described by Gazzinelli-Guimarães et al<sup>18</sup>, i.e., the eggs were isolated from the female uteri via gentle mechanical maceration, purified by straining and cultured to embryonation in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. The eggs were incubated in 50 mL culture flasks and kept in a controlled temperature chamber at 26±1°C, being oxygenated three times per week by stirring. Embryonation was evaluated microscopically once a week and the percentage of embryonated eggs was calculated by three independent experiments using three aliquots of 10 µL egg suspension for each time point.

### **Animals**

BALB/c mice obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Minas Gerais were kept on a normal light/dark cycle (12 hours) in a climate-controlled environment (25°C) throughout the study. The animals were maintained in collective cages and were fed with laboratory chow (Purina®) and tap water *ad libitum*.

Mice were maintained and infected in accordance with the institutional and national guidelines. The protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA) of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (Protocol# 181/2013).

### **Experimental infection**

The experimental infection was performed using fully embryonated eggs from a single 6 weeks old culture. For the inoculation, the culture of eggs was incubated

with 5% sodium hypochlorite in a CO<sub>2</sub> incubator for 2 hours to disrupt the outer egg layer and, thus, facilitate larval hatching, followed by five washes with a saline solution to remove the sodium hypochlorite.

The animals were inoculated via intra-gastric route, by gavage, with a single dose of 1000 embryonated *T. canis* eggs in 0.2 mL of saline solution, followed by 0.1 mL of H<sub>2</sub>O to wash out the remaining eggs in the syringe and needle.

#### **Characterization of *T. canis* larval migration pattern in mice**

BALB/c mice (8 weeks old, female) were euthanized at 1, 3, 5, 7 and 14 days post-infection (p.i.). Liver, lungs and brain were removed from six animals per time point of infection and sliced finely with scissors and placed in a Baermann apparatus in PBS buffer for 4 hours at 37°C, for total larval recovery. After that, the larvae were recovered in the pellet, fixed with formalin (10%) and quantified under a light microscope.

#### **Histopathology and morphometry of tissues of *T. canis*-infected mice**

At 0, 7 and 14 days p.i., the liver, lung and brain were removed from seven animals per time point of infection and fixed in 10% buffered formaldehyde pH 7.2. After processing in alcohol and xylol, fragments were embedded in paraffin and 4 µm thick sections were obtained and stained with haematoxylin and eosin (H&E).

The tissues were analyzed with the use of the KS400 software coupled to a Carl Zeiss image analyzer (Oberkochen, Germany) as described by Caliari et al<sup>19</sup>.

To evaluate tissue damage, sections were thoroughly analyzed and all digitized images of the liver and brain were captured at 100x and 400x magnification, respectively, using a JVC TK-1270/RGB micro camera (Tokyo, Japan). All sections were digitized with a 300 dpi resolution and each image pixel was used in order to

create a binary image to calculate the total area of each tissue. The area in  $\mu\text{m}^2$  of the lower section was used as a standard tissue for statistical analysis<sup>20</sup>.

To evaluate the intensity of lung inflammation, the degree of septum thickening was calculated. Thirty random images were captured 200x magnification, using a JVC TK-1270/RGB micro camera (Tokyo, Japan), comprising an area of  $13.2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  for statistical analysis<sup>21</sup>.

### **Systemic analysis**

For hematological analysis, blood was collected (500  $\mu\text{L}$ ) from the retro orbital sinus of thirty-six mice at 0 (uninfected group), 1, 3, 5, 7 and 14 days p.i., using a capillary pipette with anticoagulant (EDTA). After that, the blood was centrifuged and the plasma was collected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  for further cytokine measurement.

### **Hematological analysis**

Global counts of erythrocytes, leukocytes and platelets was performed with a hematological analyzer (Bio 2900 Vet, Bioeasy, USA). For differential white blood cell counting, blood smears were Giemsa stained and one hundred white blood cells were differentiated under the light microscope.

### **Cytokine profile**

The profile of plasmatic  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  and regulatory cytokines was determined by quantification of IL-4 (DY404), IL-5 (DY405), IL-6 (DY406), IL-10 (DY417), IL-13 (DY413), IL-17 (DY421), IL-33 (DY3626), IFN- $\gamma$  (DY485) and TNF- $\alpha$  (DY410) by ELISA immunoassay according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, USA). The absorbance was determined with a VersaMax ELISA Microplate reader (Molecular Devices, USA) at a wavelength of 490nm and the

cytokine concentrations (pg/mL) for each sample were calculated by interpolation from a standard curve, run with each plate.

### **Statistical analysis**

Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc, USA) was used for the statistical analysis. To verify the data distribution, the D'Agostino-Pearson and Shapiro-Wilk normality test was used. Ordinary one-way ANOVA and Holm-Sidak's multiple comparisons test were applied for the pattern of migration of *T. canis* larvae and for hematological profiles. Cytokine profiles were analyzed and compared with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test. The morphometric analysis that compared only two groups used unpaired t test. Statistically significant differences were considered if the p value was  $\leq 0.05$ .

## **Results**

### **In vitro *T. canis* eggs embryonation over time**

Approximately 700.000 eggs of *T. canis* were cultured in 0.2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the egg embryonation time was assessed over 8 weeks at 26°C (Figure 1). After 6 weeks of cultivation, 53% of eggs were fully embryonated and this value remained stable until the end of the experiment.

### **The pattern of migration of *T. canis* larvae in mice**

To determine the pattern of migration of *T. canis* in early toxocariasis, infected BALB/c mice had larvae recovered from liver, lungs and brain at 0, 1, 3, 5, 7 and 14 days p.i. (Figure 2). The results revealed that after 1 day p.i., *T. canis* larvae were predominantly recovered from the liver (Figure 2A), while after 3 days p.i. the majority of larvae was found in the lung (Figure 2B). After this period of time, larvae started to leave the lungs and migrate to the brain, where they were found consistently after 5 days p.i., remaining *in situ* at least for 14 days p.i. (Figure 2C).

### **Tissue damage caused by *T. canis* larvae migration of early infection**

To evaluate the damage caused by the migration of larvae in the tissues, liver, lungs and brain were removed and histopathological and morphometrical analyses were performed under the light microscope.

The histopathological evaluation of the liver from uninfected animals showed normal histological appearance with the hepatic tissue formed by the lobular vein center surrounded by cords of hepatocytes and sinusoidal capillaries. The hepatocytes presented with polygonal shape and central spherical nucleus (Figure 3A). The liver from animals at 7 days p.i. showed regions with moderate focal inflammatory infiltrate consisting primarily of eosinophils and neutrophils, and occasionally small regions were permeated with necrosis of hepatocytes and polymorphonuclear cell infiltration. Perivascular inflammatory infiltration was also observed (Figure 3B). The liver from animals at 14 days p.i. showed lesions in the hepatic parenchyma, characterized by large areas with intense inflammatory infiltrates, composed by neutrophils and eosinophils, as well as areas with moderate hepatic necrosis associated with polymorphonuclear inflammatory infiltrate. Intensive perivascular inflammatory infiltrates were also present (Figure 3C and 3D). The lesion area of the liver was larger due to the duration of the infection (Figure 4), however, no larvae were found in the different tissues.

The histopathological evaluation of the lung parenchyma from uninfected animals showed normal histological appearance, with aerated alveoli and alveolar and interlobular septa of normal thickness (Figure 5A). The lung from animals at 7 and 14 days p.i. showed parenchymal lesions characterized by extensive thickening of the septum at the expense of the presence of intense inflammatory infiltrate composed by eosinophils, lymphocytes, macrophages and the presence of hemorrhagic areas (Figure 5B). Inflammatory infiltrate was found filling alveolar lumens and along the



bronchioles and blood vessels, with the same cellular profile of the septum infiltrate (Figure 5C). The lesion area of the lung showed no difference from 7 days p.i. to 14 days p.i., with lesion area of  $1943 \pm 264$  and  $2242 \pm 517 \mu\text{m}^2$ , respectively.

The histopathological evaluation of the brain from uninfected animals showed normal histological appearance (Figure 5D). Brains from infected animals at 7 and 14 days p.i. presented variable sized cavities partially filled with blood (hemorrhagic cavities) (Figure 5E) and scattered larvae were visualized in the cerebrum and brainstem (Figure 5F). The lesion area of the brain showed no difference from 7 days p.i. to 14 days p.i., with hemorrhagic areas of  $1634 \pm 1088$  and  $859 \pm 492 \mu\text{m}^2$ , respectively.

#### **Hematological profile of *T. canis*-infected BALB/c mice**

The hematological profile was evaluated during all time points of the infection (Table 1). The most important findings demonstrated a progressive increase of neutrophils, peaking at 7<sup>th</sup> day of infection, which returned to baseline levels at 14<sup>th</sup> p.i. Moreover, peripheral eosinophilia was also evident after 7 days of infection, persisting up to 14 days p.i. The monocyte counting showed no variation during the experiments.

Analysis of the red blood cell compartment demonstrated a significant reduction of total erythrocytes and hemoglobin levels at the 5<sup>th</sup> day of infection when compared to the other groups. No differences were observed on platelets counting.

#### **Plasmatic cytokine profile during early *T. canis* infection**

In order to characterize the systemic immune response during early *T. canis* infection the plasmatic levels of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 and regulatory cytokines were measured at different time points of infection.

Notably, *T. canis* parasites are inducing a mix of innate inflammatory/ $T_H17$  and/ $T_H2$  response during early larval migration, with the predominance of the latter one. The  $T_H2$  response was evidenced by a significant increase in IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33 levels. Additionally, increasing levels of IL-6 and IL-17 were also observed during the early course of infection (Figure 6). On the other hand, no differences were observed for systemic TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  production (data not shown).

The results related to IL-5 revealed an early, significant and progressive increase of this cytokine from the 3<sup>rd</sup> day of infection until the 7<sup>th</sup> day p.i and then dropped off to baseline values (Figure 6A). This early increase was also seen for IL-6 secretion at the 3<sup>rd</sup> day of infection (Figure 6B). Interestingly, the IL-4, IL-13 and IL-17 secretion pattern was similar and was characterized by a significant increase after 14 days p.i. (Figure 6C, 6D and 6E). Finally, IL-33 revealed slightly elevated concentrations in plasma samples from infected animals from the 5<sup>th</sup> day onwards, however, the increase was not statistically significant when compared with uninfected animals (Figure 6E). No significant increase in IL-10 secretion was observed during the early phase of infection with *T. canis* (data not shown).

## Discussion

With the aim to study the manifestations of early *T. canis* infection in mice, we evaluated kinetics of larval recovery in different organs, as well as, immunopathological aspects in affected tissues and systemic immune responses during the first two weeks of infection.

Studies on the effects of migrating *Toxocara* larvae in paratenic animal models are justified by a certain similarity to human toxocariasis and can elucidate unknown mechanisms of host-parasite interactions<sup>13</sup>. In the present experiments, we used female BALB/c mice because of their susceptibility to *T. canis* larvae and much

higher parasite loads, when compared with other mouse strains, especially in the brain, which make them a suitable model for studies on visceral toxocariasis and neurotoxocariasis<sup>22</sup>.

In the environment, feces of dogs and cats contain unembryonated *T. canis* eggs, which will develop to infective eggs under optimal temperature and humidity within 9-15 days (see Schnieder et al<sup>23</sup> for review), turning them infectious for the final or paratenic hosts. In cold temperate regions, *T. canis* eggs in the soil were reported to become infective after 4-6 weeks<sup>24</sup>. We used *in vitro* conditions as described for *Ascaris* spp. egg embryonation<sup>18</sup> and obtained infective stages of the eggs after 4-6 weeks, as well.

About the migratory route of *T. canis* larvae, a previous review by Othman<sup>25</sup> showed that there are controversies about the migratory route and accumulation of larvae in different organs during the acute and chronic phase. To his best knowledge and own experience, he described histological findings and recovery of motile larvae from different sites of infection to be a continuous process, which most probably is not a one-way route from the intestinal wall, through the lungs and to the brain. In the present study with BALB/c mice, we were able to show a clear concentration of migrating larvae in the liver (day 1 p.i.), lungs (day 3 p.i.) and brain (from day 5 p.i. onwards), at least during the initial phase of acute infection. These results suggest a determination of migrating *T. canis* larvae in BALB/c mice and the possibility of neurological sequelae as soon as 5 days post-infection. Nevertheless, the determination of migrating larvae to reach the brain does not exclude the presence of viable and migrating larvae in other organs or in muscle tissue, which were not analyzed here.

A similar time frame of brain infection was observed when BALB/c mice were infected with even lower doses of embryonated eggs and the number of recovered larvae from brain tissue was shown to be proportional to the number of inoculated infective stages<sup>26</sup>. These authors explained this phenomenon mainly by the incapacity of the liver to retain the larvae, thus allowing their migration to the brain. The tendency towards accumulating larvae in the brain might be due to the fact that the parasites induce behavioural changes in the paratenic host and increase their chances of being predated by the definitive host (reviewed by Schnieder et al<sup>23</sup>), or due to part of its immune evasion strategy in order to seek for immune privileged infection sites (see Othman<sup>25</sup> for review).

A histopathological study of *T. canis*-infected mice over 67 weeks revealed that granulomatous inflammatory lesions were commonly observed in the liver, lungs, and musculature from one week p.i. onwards, but were rarely seen in the brain<sup>27</sup>. Trapped larvae, however, were found only in histological sections from 12 weeks p.i. or later. Another histopathological study on liver alterations in infected Swiss mice revealed inflammatory reactions in the form of plasma cells, neutrophils, eosinophils, and aggregates of lymphocytes around central veins and in the liver parenchyma at 14 days p.i.<sup>28</sup>. In our experiments with BALB/c mice, the main cell types at inflammation sites in the liver consisted of eosinophils, neutrophils and polymorphonuclear cells, without a significant contribution of lymphocytes 7 or 14 days p.i. Specially, the high neutrophil counts are intriguing, follow the migration of larvae through organs and tissues and might be the first line of defence against *T. canis* larvae, as proposed for other protozoan parasites<sup>29</sup>. Their role during toxocariasis in paratenic hosts should be investigated in further studies.

Analysis of pulmonary histopathology indicated eosinophils, lymphocytes and macrophages as main components of inflammatory infiltrates, both at 7 and at 14 days p.i. These results and other findings in the lungs corroborated with previous findings published by Pinelli et al<sup>15,17</sup> on pathological changes in the lungs 7 to 60 days after *T. canis* infections. Also, our results on brain lesions were in agreement with Othman et al<sup>30</sup>, who showed that in Swiss mice infected with *T. canis* motile larvae were more abundant in the cerebrum, without being trapped by an inflammatory reaction, causing vascular congestion and haemorrhages in the brain. The cerebrum as preferential location of larvae in the brain was also reported by Janecek et al<sup>31</sup>.

In order to accompany findings from larval recovery, haematology and histopathology, we measured the secretion of cytokines in peripheral blood samples during early *T. canis* infection. In accordance with the elevated numbers of neutrophils and eosinophils in peripheral blood and histological sections, we were able to detect a prominent rise in T<sub>H</sub>2 cytokines, such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-33, during the acute phase of infection, particularly from the 3<sup>rd</sup> day p.i. onwards. However, maximum T<sub>H</sub>2 response and recruitment of innate effector cells seem to lag behind the rapid migration of larvae through the tissues of liver and lungs and at this early phase no granuloma formation or trapping of larvae was observed in tissues. Based on unspecific and parasite-specific antibody responses, a polarization towards a T<sub>H</sub>2 immune response at later time points of experimental *Toxocara* infection was already stated by others<sup>17,27</sup>. Interestingly, the quantification of IL-4 and IL-5 levels via PCR in the lungs at 7 and 14 days p.i.<sup>17</sup> followed exactly our cytokine profile in plasma samples of infected animals. While these authors found elevated levels of IL-10 in the lungs at 7 and 14 days p.i., we did not find elevated IL-10 concentrations in

peripheral blood throughout our experiments, which indicates the production of this regulatory cytokine merely at the site of infection.

Takamoto et al<sup>32</sup> showed that *Toxocara*-infected mice showed a biphasic rise in eosinophilia during infection. They were able to show in CD4-deficient mice, that the first rise at 10 days p.i. is part of the innate immune response, whereas the second peak in eosinophilia, three weeks p.i., is dependent on CD4 T cells and part of the adaptive immune response. We also measured a rise of eosinophil counts at 7 and 14 days p.i. as part of the innate immune response. When compared with eosinophil counts, the initial rise of neutrophil counts in peripheral blood until 7 days p.i. was more prominent and as such these cells seem to play an important role during innate anti-parasite responses. Besides the decrease of neutrophil counts on day 14, similar responses in the hematological profile were reported by Pecinali et al<sup>16</sup>.

Apart from the T<sub>H</sub>2 cytokines, IL-6 and IL-17 were detected in peripheral blood during the first three days of infection. Whereas IL-6 dropped-off to baseline levels on the following days, elevated concentrations for IL-17 in the peripheral blood were still detected on days 7 and 14 p.i. IL-6 is considered one of the major pro-inflammatory cytokines and acts on a variety of cells, including immune-competent cells and hematopoietic cells, to cause proliferation and differentiation. It is produced by various cell types such as T cells, B cells, monocytes, macrophages, dendritic cells, fibroblasts, endothelial cells, glial cells and regulates the immune response and inflammation<sup>33</sup>. Furthermore, in conjunction with TGF- $\beta$ , IL-6 links innate immune responses with T cell effector mechanisms and promotes the development of T<sub>H</sub>17 cells<sup>34</sup>. IL-6 plays a key role in the development of the CD4 T<sub>H</sub>17 cell line and both IL-6 and IL-17, if upregulated, can lead to chronic inflammatory processes and disease<sup>35</sup>.

Most recently, it was shown in *Nippostrongylus brasiliensis* infected BALB/c mice, that host chitinase-like proteins (CLPs) induce neutrophil activation and, together with IL-17A produced by activated  $\gamma\delta$  T cells, contribute to larval elimination at the price of enhanced lung damage during larval migration<sup>36</sup>. In order to limit acute tissue damage, a switch to adaptive T<sub>H</sub>2 responses was shown from the 4<sup>th</sup> day p.i. for the same parasite<sup>37</sup>. In our model, we found elevated T<sub>H</sub>2 cytokines in the peripheral blood from the 3<sup>rd</sup> day p.i. onwards, without any contribution of IFN- $\gamma$ . Therefore, similar mechanisms and timing of immune responses might take place during infection with *T. canis*, as well. A more complete inflammatory profile, the possible contribution of CLPs and the regulation by T<sub>H</sub>2 cytokines should be issues of future research in early experimental toxocariasis.

## Conclusions

In conclusion, we presented new insights on pro-inflammatory responses, innate effector cell activation and polarized T<sub>H</sub>2 immune responses during early *T. canis* infection in experimentally infected BALB/c mice. The results contribute to a better understanding of immunopathological events that also may occur during human toxocariasis, thus contributing to future strategies of diagnosis and control.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

NMR, PHGG, FSB, GTV, LLB, SMG and RTF conceived the research and interpreted the data for the work. NMR, PHGG, FSB, LMO, DSN, MTPG, ACGG, CCOA collected samples and contributed to the data analysis. NMR, CCOA, FMSO,

MVC and MAR performed the histological study and contributed to the data analysis and interpretation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

## **Acknowledgements**

This work was financially supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, Brazil (Grant# CBB APQ-2167-13), the Brazilian National Research Council (CNPq) (Grant# 479613/2012-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, Brazil (Edital Parasitologia Básica) and Pró-Reitoria de Pesquisa of Federal University of Minas Gerais. RTF is supported by CNPq fellowships.

## **Disclaimer**

This document is provided for scientific purposes only. Any reference to a brand or trademark herein is for informational purposes only and is not intended for a commercial purpose or to dilute the rights of the respective owner(s) of the brand(s) or trademark(s).

## **References**

1. Macpherson CN. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *Int J Parasitol.* 2013 Nov;43(12-13):999-1008.
2. Alcântara-Neves NM, de S G Britto G, Veiga RV, Figueiredo CA, Fiaccone RL, da Conceição JS, Cruz AA, Rodrigues LC, Cooper PJ, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML. Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC Res Notes.* 2014 Nov 19;7:817.
3. Overgaauw PA, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 2013 Apr 15;193(4):398-403.



4. Oge H, Oge S, Ozbakış G, Gürcan S. Comparison of *Toxocara* eggs in hair and faecal samples from owned dogs and cats collected in Ankara, Turkey. *Vet Parasitol.* 2014 Oct 12;206(3-4):227-231.
5. Chen F, Liu Z, Wu W, Rozo C, Bowdridge S, Millman A, Van Rooijen N, Urban JF Jr, Wynn TA, Gause WC. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med.* 2012 Jan 15;18(2):260-6.
6. Cardillo N, Rosa A, Ribicich M, López C, Sommerfelt I. Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB/c mice, migratory behaviour and pathological changes. *Zoonoses Public Health.* 2009 May;56(4):198-205.
7. Fan CK, Liao CW, Cheng YC. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: genetics and environment. *Vet Parasitol.* 2013 Apr 15;193(4):342-52.
8. Schoenardie ER, Scaini CJ, Avila LF, Sperotto RL, Borsuk S, Felicetti CD, Pepe M, Berne ME. Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014 Jul-Sep;23(3):403-6.
9. Schoenardie ER, Scaini CJ, Pepe MS, Borsuk S, de Avila LF, Villela M, Berne ME. Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2013 Oct-Dec;22(4):623-6.
10. Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol.* 2001 Dec;75(4):299-305.
11. Maizels RM. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol.* 2013 Apr 15;193(4):365-74.

12. Bashi T, Bizzaro G, Ben-Ami Shor D, Blank M, Shoenfeld Y. The mechanisms behind helminth's immunomodulation in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014 Oct 16. pii: S1568-9972(14)00216-X.
13. Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):733-44.
14. Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 2011 Jun;11(6):375-88.
15. Pinelli E, Withagen C, Fonville M, Verlaan A, Dormans J, van Loveren H, Nicoll G, Maizels RM, van der Giessen J. Persistent airway hyper-responsiveness and inflammation in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice. *Clin Exp Allergy.* 2005 Jun;35(6):826-32.
16. Pecinali NR, Gomes RN, Amendoeira FC, Bastos AC, Martins MJ, Pegado CS, Bastos OM, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC. Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. *Vet Parasitol.* 2005 Nov 25;134(1-2):121-30.
17. Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Fonville M, Hamilton CM, der Giessen Jv. *Toxocara canis*: effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 2007 Jan;115(1):76-82.
18. Gazzinelli-Guimarães PH, Gazzinelli-Guimarães AC, Silva FN, Mati VL, Dhom-Lemos L de C, Barbosa FS, Passos LS, Gaze S, Carneiro CM, Bartholomeu DC, Bueno LL, Fujiwara RT. Parasitological and

- immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *Int J Parasitol.* 2013 Aug;43(9):697-706.
19. Caliari MV, Lana M, Leite VH, Tafuri WL. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int J Exp Pathol.* 1995 Aug;76(4):299-307.
20. Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliari MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite.* 2007 Dec;14(4):329-34.
21. Rodrigues-Machado M da G, Silva GC, Pinheiro MB, Caliari MV, Borges EL. Effects of sepsis-induced acute lung injury on glycogen content in different tissues. *Exp Lung Res.* 2010 Jun;36(5):302-6.
22. Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol.* 2013 Apr 15;193(4):375-89.
23. Schnieder T, Laabs EM, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol.* 2011 Feb 10;175(3-4):193-206.
24. Zibaei M, Abdollahpour F, Birjandi M, Firoozeh F. Soil contamination with *Toxocara* spp. eggs in the public parks from three areas of Khorram Abad, Iran. *Nepal Med Coll J.* 2010 Jun;12(2):63-5.
25. Othman AA. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind? *Acta Trop.* 2012 Dec;124(3):171-8.
26. Ollero MD, Fenoy S, Cuéllar C, Guillén JL, Del Aguila C. Experimental toxocariosis in BALB/c mice: effect of the inoculation dose on brain and eye involvement. *Acta Trop.* 2008 Feb;105(2):124-30.

27. Fan CK, Lin YH, Du WY, Su KE. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol.* 2003 Apr 18;113(2):145-55.
28. Othman AA, Ashour DS, Mohamed DA. *Toxocara*-induced hepatic inflammation: immunohistochemical characterization of lymphocyte subpopulations and Bcl-2 expression. *Exp Parasitol.* 2013 May;134(1):76-81.
29. Hermosilla C, Caro TM, Silva LM, Ruiz A, Taubert A. The intriguing host innate immune response: novel anti-parasitic defence by neutrophil extracellular traps. *Parasitology.* 2014 Sep;141(11):1489-98.
30. Othman AA, Abdel-Aleem GA, Saied EM, Mayah WW, Elatrash AM. Biochemical and immunopathological changes in experimental neurotoxocariasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2010 Jul;172(1):1-8.
31. Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasit Vectors.* 2014 Apr 22;7:194.
32. Takamoto M, Wang ZX, Watanabe N, Matsuzawa A, Nariuchi H, Sugane K. Eosinophilia, IgE production, and cytokine production by lung T cells in surface CD4-deficient mutant mice infected with *Toxocara canis*. *Immunology.* 1998 Sep;95(1):97-104.
33. Ohsugi Y. Recent advances in immunopathophysiology of interleukin-6: an innovative therapeutic drug, tocilizumab (recombinant humanized anti-human interleukin-6 receptor antibody), unveils the mysterious etiology of

- immune-mediated inflammatory diseases. *Biol Pharm Bull.* 2007 Nov;30(11):2001-6.
34. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006 Feb;24(2):179-89.
35. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56.
36. Sutherland TE, Logan N, Rückerl D, Humbles AA, Allan SM, Papayannopoulos V, Stockinger B, Maizels RM, Allen JE. Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a tradeoff between nematode killing and host damage. *Nat Immunol.* 2014 Dec;15(12):1116-25.
37. Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, Wang CR, Zhu XQ. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect Genet Evol.* 2012 Oct;12(7):1344-8.

## Figure Legends

**Figure 1 - Embryonation index of *Toxocara canis* eggs.**

**Figure 2. Migratory route of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mice during 14 days of infection.** (A) Number of larvae recovered from the liver. (B) Number of larvae recovered from the lungs. (C) Number of larvae recovered from the brain. Each group consisted of six animals per time point of infection. Horizontal bars represent mean values  $\pm$  SD. Significant differences between the groups are indicated by an asterisk ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 3. Liver parenchyma of *Toxocara canis*-infected BALB/c mice.** (A) Control group: normal liver parenchyma with H&E staining. Bar = 100 $\mu$ m. (B) 7 days post-infection (p.i.): inflammatory infiltration (arrowheads) and small area of hepatic necrosis (\*). H&E. Bar = 100 $\mu$ m. (C) 14 days p.i.: area with intense inflammatory infiltration (arrowheads) and hepatic necrosis (\*). H&E. Bar = 100 $\mu$ m. (D) 14 days p.i.: higher magnification of the previous figure showing inflammatory infiltrate consisting of eosinophils (arrowheads) and neutrophils (arrows) as well as necrosis (\*). H&E. Bar = 50 $\mu$ m.

**Figure 4. Morphometry of lesion areas in the liver of BALB/c mice at 7 and 14 days post-infection with *Toxocara canis*.** Data are presented as mean values  $\pm$  SD of seven animals per time point. Significant differences between the groups are indicated ( $p = 0,0177$ ).

**Figure 5. Lung and brain parenchyma of BALB/c mice infected with *Toxocara canis*.** (A) Control group: normal lung parenchyma. H&E staining. Bar = 50µm. (B) 14 days post-infection (p.i.): thickening of the septum by the inflammatory infiltrate (arrowheads) and hemorrhagic areas (\*). H&E. Bar = 50µm. (C) Higher magnification of the previous figure (14 days p.i.) showing inflammatory infiltrates consisting of eosinophils, lymphocytes, macrophages and the presence of hemorrhagic areas (\*). H&E. Bar = 20µm. (D) Control group: normal brain parenchyma. H&E. Bar = 50µm. (E) 7 days p.i.: brain with hemorrhagic cavities (\*). H&E. Bar = 50µm. (F) 14 days p.i.: presence of larvae in the brain (arrowheads). H&E. Bar = 50µm.

**Figure 6. Plasmatic IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17 and IL-33 cytokine levels in *Toxocara canis*-infected BALB/c mice.** Data are presented as geometric means. n = six animals per time point of infection. Significant differences between the groups are indicated by asterisks (\*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001).

## Tables

**Table 1 - Peripheral blood cells of *Toxocara canis*-infected BALB/c mice.**

WBC = white blood cells. RBC = red blood cells. n = six animals per time point of infection. Data are presented as mean ± SD and relative values. For leukocytes population, significant differences ( $P \leq 0,05$ ) related to 0, 1, 3, 5, 7 and 14 dpi are represented by **a**, **b**, **c**, **d**, **e** and **f**, respectively. For red blood cells, significant differences ( $P \leq 0,05$ ) are represented by \* in relation to control group.

|                         | Days post-infection |             |             |             |                                |                                  |
|-------------------------|---------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------|----------------------------------|
|                         | 0                   | 1           | 3           | 5           | 7                              | 14                               |
| <b>WBC</b>              |                     |             |             |             |                                |                                  |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | 4.6 ± 1.4           | 2.6 ± 0.3   | 4.0 ± 0.4   | 5.2 ± 1.5   | 6.8 ± 2.1 <sup>b,c</sup>       | 6.3 ± 1.5 <sup>b,c</sup>         |
| Lymphocyte              | 3.45 ± 1.11         | 1.40 ± 0.15 | 2.50 ± 0.18 | 3.11 ± 0.88 | 3.93 ± 1.23                    | 3.54 ± 1.18                      |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | (77-87%)            | (47-61%)    | (58-68%)    | (57-63%)    | (51-67%)                       | (47-63%)                         |
| Monocyte                | 0.01 ± 0.01         | 0.03 ± 0.03 | 0.02 ± 0.02 | 0.01 ± 0.02 | 0.07 ± 0.06                    | 0.03 ± 0.04                      |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | (0-1%)              | (0-3%)      | (0-1%)      | (0-2%)      | (0-2%)                         | (0-2%)                           |
| Neutrophil              | 1.10 ± 0.42         | 1.15 ± 0.31 | 1.41 ± 0.34 | 1.86 ± 0.66 | 2.25 ± 1.12 <sup>b,c,f</sup>   | 1.00 ± 0.32                      |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | (11-23%)            | (35-51%)    | (30-40%)    | (32-38%)    | (23-41%)                       | (13-23%)                         |
| Eosinophil              | 0.03 ± 0.02         | 0.06 ± 0.03 | 0.07 ± 0.03 | 0.21 ± 0.07 | 0.48 ± 0.18 <sup>a,b,c,f</sup> | 1.68 ± 0.48 <sup>a,b,c,d,e</sup> |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | (0-2%)              | (1-5%)      | (1-3%)      | (3-5%)      | (5-13%)                        | (21-33%)                         |
| <b>RBC</b>              |                     |             |             |             |                                |                                  |
| (x 10 <sup>6</sup> /μL) | 7.0 ± 2.0           | 9.3 ± 0.7   | 9.2 ± 1.0   | 5.8 ± 1.0*  | 8.1 ± 1.3                      | 8.0 ± 0.7                        |
| Hemoglobin              | 16.7 ± 1.2          | 17.0 ± 1.4  | 17.6 ± 1.6  | 13.3 ± 1.3* | 15.8 ± 1.4                     | 17.0 ± 1.3                       |
| (g/dL)                  |                     |             |             |             |                                |                                  |
| <b>Platelet</b>         |                     |             |             |             |                                |                                  |
| (x 10 <sup>3</sup> /μL) | 722 ± 35            | 725 ± 58    | 598 ± 29    | 766 ± 57    | 758 ± 31                       | 725 ± 47                         |



Figure 1

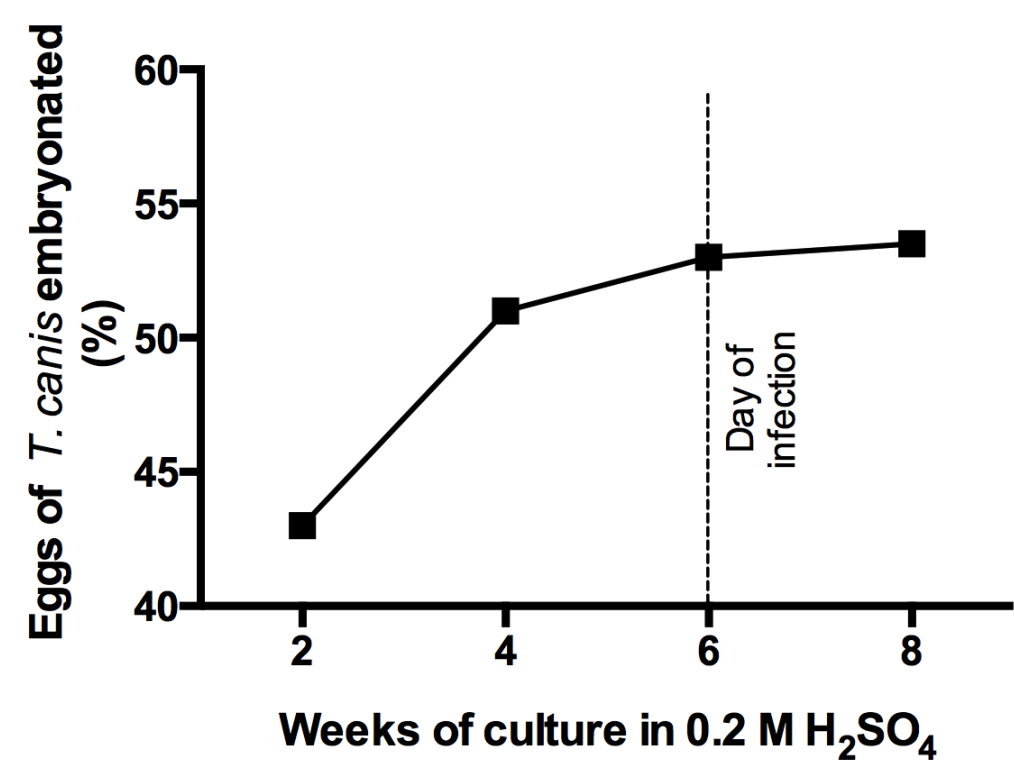


Figure 2

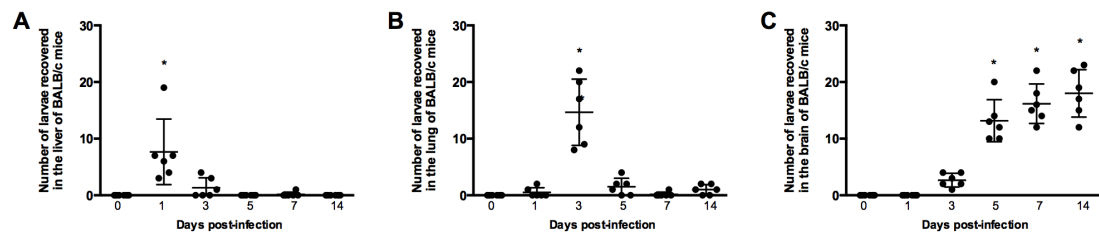


Figure 3

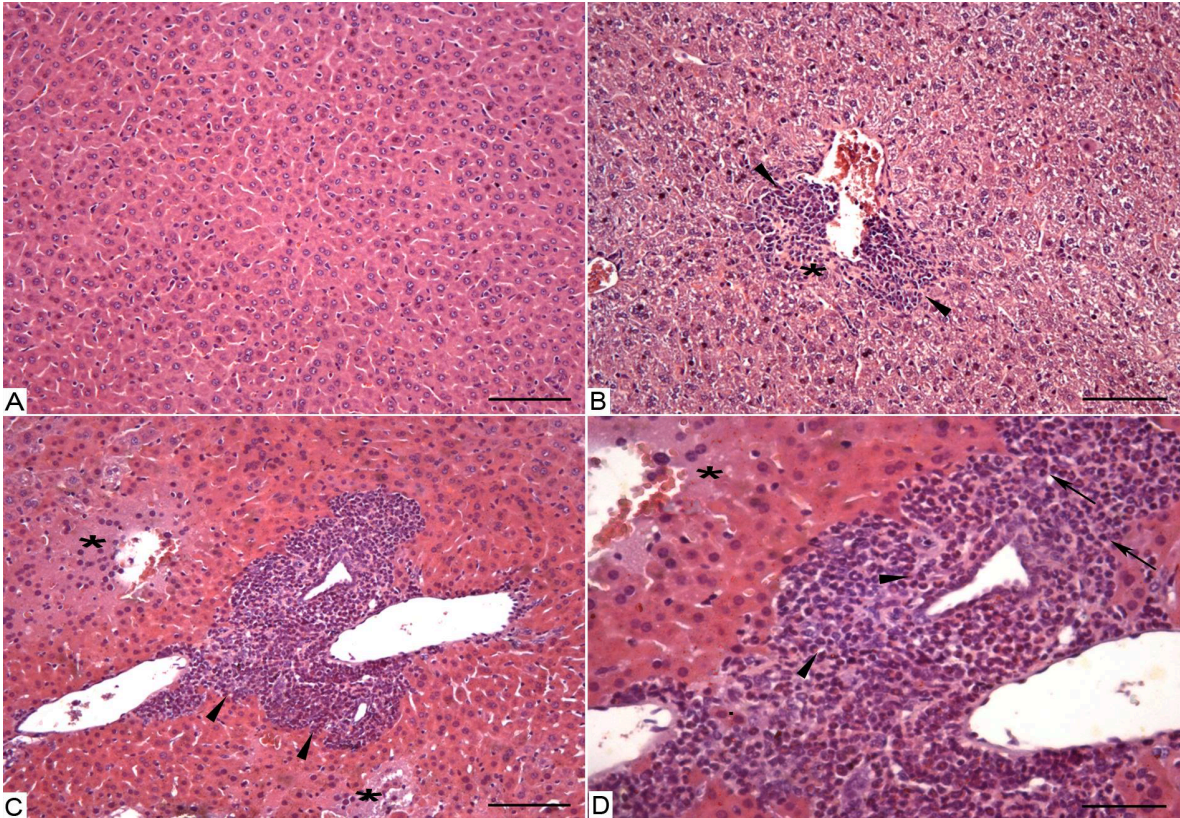


Figure 4

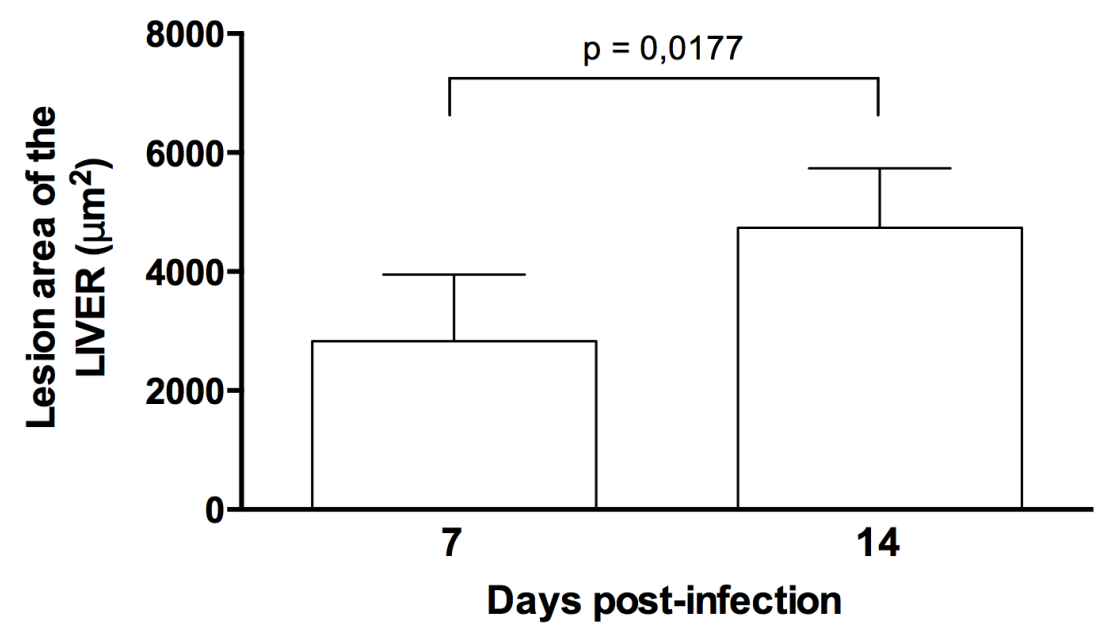


Figure 5

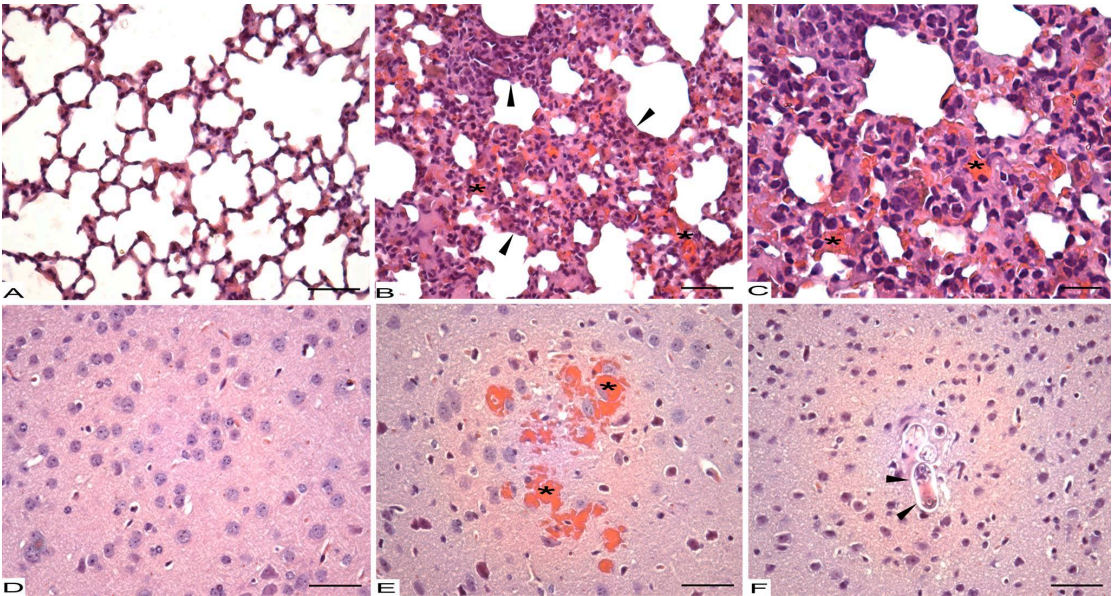


Figure 6

