

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

**Interação entre *Angiostrongylus vasorum* e  
*Ancylostoma caninum*: aspectos parasitológicos,  
hematológicos e imunológicos em cães experimentalmente  
infectados**

Ruth Massote Dracz

Belo Horizonte

2012

Ruth Massote Dracz

**Interação entre *Angiostrongylus vasorum* e  
*Ancylostoma caninum*: aspectos parasitológicos,  
hematológicos e imunológicos em cães experimentalmente  
infectados**

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia.

Orientador: Prof. Walter dos Santos Lima

Co-orientador: Prof. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

2012

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence o quem se atreve... A vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço a Deus, por ter me sustentado, dado forças e sabedoria a cada dia para conseguir seguir com perseverança meus objetivos.*

*Aos meus pais, Sérgio e Zaudiane, por todo apoio, incentivo e amor incondicional. Por estarem ao meu lado, em todos os momentos durante esse trabalho. Sem este apoio com certeza não teria chegado onde eu tanto almejava!*

*Ao meu amado irmão João Luis, pelos anos de convivência e lições de vida.*

*Ao Giovanni, por todo amor e cumplicidade, paciência e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Walter dos Santos Lima. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que tive trabalhando com ao seu lado, que me proporcionaram grande crescimento pessoal e profissional. Obrigada por ter confiado em mim e acreditado em meu potencial! O senhor sempre será um exemplo de profissional dedicado e competente em que vou me espelhar durante minha vida!

Agradeço ao Prof. Ricardo Toshio Fujiwara por ter aceitado me co-orientar durante esse trabalho. Muito obrigada por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse aprender tantas coisas novas e adquirir experiências que certamente serão muito uteis em minha vida profissional. Obrigada pelo apoio, pelas conversas e pelo incentivo!

À Professor Deborah Aparecida Negrão-Corrêa pela ajuda na interpretação dos resultados imunológicos, e ao Laboratório de Esquistossomose pelo fornecimento de *Biomphalaria glabrata* para a manutenção do ciclo de *Angiostrongylus vasorum*.

Ao professor Rodolfo Cordeiro Giunchetti e demais professores e aos alunos Bruno Roatt e Samuel Braga do Laboratório de Imunopatologia – NUPEB pelo auxílio na realização dos hemogramas.

Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a alguém que sem a ajuda e apoio eu não teria feito metade do que fiz: minha professora Wanderlany Amâncio Martins! Lembro-me até hoje da alegria em sua voz, ao me dar a notícia de que eu havia passado na seleção do mestrado. Sempre compreensiva, com a palavra certa de incentivo para me animar e acalmar! Professora muito obrigada por ter vibrado comigo durante minhas conquistas!

Agradeço a todos os amigos e colegas do Laboratório de Helminologia Veterinária. Como foram importantes para mim os momentos que passamos juntos! Quantas lágrimas, risadas, alegrias e tristezas compartilhadas! Com certeza a amizade de vocês fez com que esse caminho fosse mais fácil de percorrer!

À Lanuze, pela ajuda na interpretação dos resultados hematológicos dos cães.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – LIGP, pela ajuda e momentos agradáveis que passei com vocês. Em especial à Jackeline, Michele e Pedro, que sempre se prontificaram a me ajudar no desenvolvimento do experimento e também no esclarecimento das dúvidas. Muito obrigada!

A todos os meus colegas da turma de mestrado, em especial ao Tiago e a Lulu! Pessoas incríveis com quem sempre compartilhei momentos de discussões e aprendizagem!

Agradeço a todos os meus amigos e parentes que sempre torceram por mim! Que mesmo longe ou perto, sei que se alegraram com minhas conquistas! São tantas pessoas que não me atrevo a citar nomes, por não ser omissa com nenhum deles!

A todos os colegas, funcionários e professores do Departamento de Parasitologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. A Sumara e a Cibele, secretárias do Departamento pelo carinho e prontidão a esclarecer todas às dúvidas.

Ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade federal de Minas Gerias na pessoa da Profa. Érika Martins Braga, pelo incentivo e apoio na realização desse trabalho.

Ao apoio financeiro da Coordenadoria de aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino superior (CAPES).

## RESUMO

*Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum* são parasitos de cães que apresentam ampla distribuição geográfica e tem importante papel tanto no aspecto da clínica veterinária como da saúde pública, uma vez que podem causar grande morbidade nos cães e ser causadores de zoonoses. Com o objetivo de avaliar as alterações parasitológicas, hematológicas e imunológicas decorrentes da coinfeção por esses helmintos, foram acompanhados 19 cães sem raça definida de ambos os sexos e com idade média de 22 meses. Os animais foram divididos em quatro grupos (A, B, C e D): grupo A com 4 cães não infectados; grupo B com 5 cães com angiostrongilose crônica; grupo C com 5 cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* e grupo D com 5 cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum*. O acompanhamento parasitológico foi realizado pelas contagens de ovos e larvas por grama de fezes. As alterações hematológicas foram avaliadas por hemograma. Para avaliar a resposta imune celular durante a infecção, células mononucleares do sangue periférico foram coletadas e analisadas quanto à capacidade proliferativa *in vitro* frente a estímulo antigênico dos parasitos pela técnica de MTT; produção de citocinas *in vitro*, após estimulação com antígeno pela técnica de ELISA e para a identificação das subpopulações de leucócitos circulantes no sangue periférico *ex vivo* por citometria de fluxo. Para avaliar a resposta imune humoral plasma dos cães foram analisados pela técnica de ELISA indireta para pesquisa de IgG e IgE específicos para antígenos de *A. vasorum* e *A. caninum*. A análise dos dados evidenciou que cães coinfectados por *A. vasorum* e *A. caninum* apresentaram um menor número nas contagens de larvas por gramas de fezes quando comparados ao grupo infectado apenas com *A. vasorum*. Eosinofilia, neutrofilia, linfocitose e trombocitopenia foram observados nos grupos infectados. Não houve diferença na proliferação celular *in vitro* frente a estímulos antigênicos dos parasitos entre os grupos infectados e não infectado. Nos cães infectados com *A. vasorum* foi observado um perfil Th2 da resposta imune e nos cães coinfectados um perfil misto de Th1 e Th2. Nos grupos infectados foi detectada uma maior porcentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> circulantes quando comparados a linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócitos B CD21<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>. Em relação às imunoglobulinas analisadas, um maior nível na produção de IgG foi observado durante a fase aguda da infecção e IgE durante a fase crônica, mas sem diferença significativa entre esses valores. Após a realização deste trabalho, pode-se inferir que a coinfeção por *A. caninum* em cães com angiostrongilose promove alterações nos aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos em cães experimentalmente infectados.

## ABSTRACT

*Angiostrongylus vasorum* and *Ancylostoma caninum* are dogs parasites that are widely geographically distributed and has an important role both in the clinical aspect of veterinary and public health, since they can cause great morbidity in dogs and be the cause of zoonoses. In order to evaluate parasitological, haematological and immunological changes due to coinfection by these helminths, 19 mongrel dogs of both sexes and aged 22 months were followed. The animals were divided into four groups (A, B, C and D): Group A with four dogs uninfected group B with 5 dogs with chronic angiostrongylosis, group C with 5 dogs with chronic angiostrongylosis that were infected with *A. caninum* and group D with 5 dogs infected simultaneously with *A. vasorum* and *A. caninum*. The parasitological monitoring was performed by counting of eggs and larvae per gram of feces. Haematological abnormalities were evaluated by blood counts. To evaluate the cellular immune response during infection, peripheral blood mononuclear cells were collected and analyzed for proliferative capacity in vitro against the parasite antigen stimulation technique by MTT; cytokine production in vitro after stimulation with antigen by ELISA and for identification of subpopulations of leukocytes in the peripheral blood ex vivo by flow cytometry. To evaluate the humoral immune plasma of dogs were analyzed by indirect ELISA technique in search of IgG and IgE specific for antigens of *A. vasorum* and *A. caninum*. Data analysis showed that dogs coinfecting *A. vasorum* and *A. caninum* had fewer counts of larvae per gram of feces compared to the group infected with only *A. vasorum*. Eosinophilia, neutrophilia, lymphocytosis and thrombocytopenia were observed in the infected groups. There was no difference in cell proliferation in vitro susceptibility to antigenic stimuli of parasites between infected and uninfected groups. In dogs infected with *A. vasorum* was observed a Th2 immune response in dogs and coinfecting a mixed profile of Th1 and Th2. In the infected groups was detected a higher percentage of CD3 + CD4 + circulating T lymphocytes compared to CD3 + CD8 +, CD21 + B lymphocytes and CD14 + monocytes. Regarding to immunoglobulin analyzed, a higher level in the production of IgG was observed during acute infection and IgE during the chronic phase, but no significant difference between these values. After this work, we can infer that coinfection by *A. caninum* in dogs causes changes to aspects angiostrongylosis parasitological, hematological and immunological in experimentally infected dogs.



## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Divisão e identificação dos cães por sexo e grupo experimental ..... 37
- Quadro 2: Acompanhamento parasitológico nos grupos de cães sem infecção (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *Ancylostoma caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *Angiostrongylus vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) durante 120 dias de acompanhamento experimental ..... 39
- Quadro 3: Grupo dos cães utilizados no experimento, ponto de avaliação, aspecto avaliado e dia pós infecção para a dosagem das citocinas no plasma e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos cães ..... 43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Período pré-patente da infecção (dias após a infecção) por *Ancylostoma caninum* e *Angiostrongylus vasorum* encontrados no grupo C – cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com 100 L3 kg/pv de *A. caninum* e no grupo D – cães infectados simultaneamente com 100 L3 kg/pv de *A. vasorum* e 100 L3 kg/pv de *A. caninum*..... 46

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Médias da eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* por grama de fezes (LPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) ... 48
- Gráfico 2: Média da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 48
- Gráfico 3: Valores médios de hemácias em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 49
- Gráfico 4: Valores médios da concentração de hemoglobina em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 50
- Gráfico 5: Valores médios do hematócrito em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 51
- Gráfico 6: Valores da concentração média de hemoglobina (CMH) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 52
- Gráfico 7: Valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 53

Gráfico 8: Valores do volume corpuscular médio (VCM) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 54

Gráfico 9: Média da contagem global de leucócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 55

Gráfico 10: Média da contagem global de neutrófilos bastonetes em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 56

Gráfico 11: Média da contagem global de neutrófilos segmentados em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 57

Gráfico 12: Média da contagem global de linfócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 58

Gráfico 13: Média da contagem global de eosinófilos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 59

Gráfico 14: Média da contagem global de monócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com

*A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 60

Gráfico 15: Média da contagem global de basófilos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 61

Gráfico 16: Valores de plaquetas (PLT) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 62

Gráfico 17: Valores de plaquetócrito (PCT) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 63

Gráfico 18: Média do peso dos cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 64

Gráfico 19: Variação de peso dos cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ao final de 120 dias de acompanhamento ..... 65

Gráfico 20. Média da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D), estimuladas com antígeno bruto solúvel de vermes adultos de *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum* ..... 66

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cinética da eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* e de ovos de *Ancylostoma caninum* por grama de fezes (LPG, OPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ..... 47

Figura 2: Valores médios da concentração de citocinas no plasma de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfectedos com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D). As letras representam os gráficos: A (TNF- $\alpha$   $\mu\text{g/mL}$ ), B (IL-12/IL-23p40  $\mu\text{g/mL}$ ), C (IFN- $\gamma$   $\mu\text{g/mL}$ ), D (IL-4  $\mu\text{g/mL}$ ) e E (IL-10  $\mu\text{g/mL}$ ). As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as médias do grupo B ..... 68

Figura 3: Valores médios da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de cães não infectados (GA), cães com angiostrongilose crônica (GB) e cães coinfectedos com *A. vasorum* e *A. caninum* (GC e GD) estimuladas com antígenos de *A. vasorum* e *A. caninum*. As letras representam os gráficos: A ( $\Delta$  TNF- $\alpha$   $\mu\text{g/mL}$ ), B ( $\Delta$  IL-12/IL-23p40  $\mu\text{g/mL}$ ), C ( $\Delta$  IFN- $\gamma$   $\mu\text{g/mL}$ ), D ( $\Delta$  IL-4  $\mu\text{g/mL}$ ) e E ( $\Delta$  IL-10  $\mu\text{g/mL}$ ). As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as médias encontradas no grupo B ..... 70

Figura 4: Porcentagem média de células circulantes no sangue periférico *ex vivo* de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfectedos com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D), analisadas por citometria de fluxo. As letras representam os gráficos: A (% LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), B (% LT CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), C (% LB CD21<sup>+</sup>) e D (% M CD14<sup>+</sup>).

Figura 5: Reatividade de anticorpos anti-antígenos brutos de *Angiostrongylus vasorum* e de *Ancylostoma caninum* em plasma de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfectedos com *A. vasorum* e *A. caninum*

(Grupos C e D). Os resultados estão expressos como média dos valores de densidade óptica (DO)  $\pm$  desvio padrão. As letras representam os gráficos: A (IgG), B (IgE) ..... 73

## LISTA DE ABREVIACÕES

CD14 - Marcador de superfície celular da população de monócitos  
CD21 - Marcador de superfície celular da população de linfócitos B  
CD3 - Marcador de superfície celular da população de linfócitos T  
CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T  
CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T  
CETEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal  
CGL - Contagem Global de Leucócitos  
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
Cm - Centímetro  
CMH - Concentração Média de Hemoglobina  
COBEA - Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DP - Desvio padrão  
DPI - Dia Após a Infecção  
ELISA - Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima  
g - Grama  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
IFN- $\gamma$  - Interferon gama  
Ig - Imunoglobulina  
IL - Interleucina  
Kg - Quilograma  
L - Linfócitos  
L1 - Larva de primeiro estágio  
L2 - Larva de segundo estágio  
L3 - Larva de terceiro estágio  
L4 - Larva de quarto estágio  
LPG - Larvas por Grama de Fezes  
mg - Miligrama  
MG - Minas Gerais  
mL - Mililitro  
nm - Nanômetro  
OPG - Ovos Por Grama de Fezes



PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Tampão Fosfato de Sódio

PCT - Plaquetócrito

PPP - Período Pré-patente

pv - Peso Vivo

rpm- Rotação por minuto

RPMI - Meio de Cultura (*“Roswell Park Memorial Institute”*)

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

VCM - Volume Corpuscular Médio

VG - Volume Globular

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrômetro

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 22 |
| 2. ANGIOSTRONGYLUS .....  | 23 |
| 2.1 Morfologia .....  | 24 |
| 2.2 Ciclo biológico .....   | 24 |
| 2.3 Distribuição geográfica .....   | 25 |
| 2.4 Quadro clínico e patologia .....  | 26 |
| 3. ANCYLOSTOMA CANINUM .....  | 27 |
| 3.1 Morfologia .....  | 27 |
| 3.2 Ciclo biológico .....   | 27 |
| 3.3 Distribuição geográfica .....   | 28 |
| 3.4 Quadro clínico e patologia .....  | 29 |
| 4. RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE A INFECÇÃO POR A. VASORUM E A. CANINUM ..... | 29 |
| 5. JUSTIFICATIVA .....  | 31 |
| 6. OBJETIVOS .....  | 32 |
| 6.1 Objetivo geral .....  | 32 |
| 6.2 Objetivos específicos .....   | 32 |
| 7. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 33 |
| 7.1 Parasitos .....   | 33 |
| 7.2 <i>Angiostrongylus vasorum</i> .....                                      | 33 |
| 7.2.1 Obtenção de larvas de primeiro estágio (L1) .....                       | 33 |
| 7.2.2 Obtenção de larvas de terceiro estágio (L3) .....                       | 34 |
| 7.2.3 Obtenção de parasitos adultos de <i>A. vasorum</i> .....                | 34 |

|  |    |
|--|----|
| 7.3 <i>Ancylostoma caninum</i> .....   | 35 |
| 7.3.1 Obtenção de larvas de terceiro estágio (L3).....   | 35 |
| 7.3.2 Obtenção de parasitos adultos de <i>A. caninum</i> .....   | 35 |
| 7.4 Seleção dos animais, divisão dos grupos e infecções experimentais .....  | 36 |
| 7.5 Acompanhamento parasitológico dos cães .....   | 38 |
| 7.6 Avaliação hematológica .....   | 39 |
| 7.7 Aferição do peso corporal .....  | 40 |
| 7.8 Preparação de antígeno bruto solúvel de <i>A. vasorum</i> e <i>A. caninum</i> .....  | 40 |
| 7.9 Resposta imune celular e humoral .....   | 41 |
| 7.9.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico .....  | 41 |
| 7.9.2 Ensaio de proliferação celular .....   | 42 |
| 7.9.3 Determinação da produção de citocinas no plasma de cães e em sobrenadantes de<br>culturas .....                                      | 42 |
| 7.9.4 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico <i>ex-vivo</i> por citometria de<br>fluxo.....  | 44 |
| 7.9.5 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto<br>solúvel de <i>A. vasorum</i> e <i>A. caninum</i> ..... | 45 |
| 7.10 Análise estatística .....   | 45 |
| 8. RESULTADOS .....  | 46 |
| 8.1 Acompanhamento parasitológico .....  | 46 |
| 8.2 Avaliação hematológica .....   | 49 |
| 8.2.1 Hemograma .....  | 49 |

|   |    |
|---|----|
| 8.2.1.1 Hemácias .....  | 49 |
| 8.2.1.2 Hemoglobina .....   | 50 |
| 8.2.1.3 Hematócrito .....   | 51 |
| 8.2.1.4 Concentração média de hemoglobina .....   | 52 |
| 8.2.1.5 Concentração de hemoglobina corpuscular média .....   | 53 |
| 8.2.1.6 Volume corpuscular médio .....  | 54 |
| 8.2.2 Leucograma .....  | 55 |
| 8.2.2.1 Contagem global de leucócitos .....   | 55 |
| 8.2.2.2 Neutrófilos bastonetes .....  | 56 |
| 8.2.2.3 Neutrófilos segmentados .....   | 57 |
| 8.2.2.4 Linfócitos .....  | 58 |
| 8.2.2.5 Eosinófilos .....   | 59 |
| 8.2.2.6 Monócitos .....   | 60 |
| 8.2.2.7 Basófilos .....   | 61 |
| 8.2.3 Avaliação das plaquetas .....   | 62 |
| 8.3 Peso dos cães .....   | 64 |
| 8.4 Ensaio de proliferação celular .....  | 66 |
| 8.5 Determinação da produção de citocinas no plasma de cães e em sobrenadantes de culturas .....                                      | 67 |
| 8.6 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico <i>ex-vivo</i> por citometria de fluxo .....                                       | 71 |
| 8.7 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto solúvel de <i>A. vasorum</i> e <i>A. caninum</i> ..... | 72 |
| 9. DISCUSSÃO .....  | 74 |
| 9.1 Acompanhamento parasitológico .....   | 74 |
| 9.2 Avaliação hematológica .....  | 75 |
| 9.2.1 Hemograma .....   | 75 |

|   |     |
|---|-----|
| 9.2.2 Leucograma .....  | 77  |
| 9.2.3 Avaliação das plaquetas .....   | 79  |
| 9.3 Peso dos cães .....   | 80  |
| 9.4 Ensaio de proliferação celular .....  | 80  |
| 9.5 Determinação da produção de citocinas no plasma de cães e em sobrenadantes de culturas .....                                      | 82  |
| 9.6 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico <i>ex-vivo</i> por citometria de fluxo .....                                       | 84  |
| 9.7 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto solúvel de <i>A. vasorum</i> e <i>A. caninum</i> ..... | 85  |
| 10. CONCLUSÕES .....  | 88  |
| 11. REFERÊNCIAS .....   | 90  |
| 12. ANEXOS .....  | 101 |

## 1. INTRODUÇÃO

O cão como animal de estimação e companhia, desempenha um papel importante na sociedade. Alguns dos efeitos benéficos dessa relação psicossocial entre homem e cão podem ser percebidos em pessoas idosas e com deficiências, uma vez que ajudam a melhorar a saúde física e mental, reduzem a ansiedade, são fonte de contato físico e conforto, diminuindo a solidão, a depressão e aumentando a qualidade de vida. Promovem também um desenvolvimento saudável de crianças tornando-as mais responsáveis, aumentando a sociabilidade e desenvolvendo aspectos positivos em seu caráter (Edney, 1995; Jennings, 1997; Raina, 1999). Entretanto, esse estreito contato físico entre homem e cão pode se tornar um importante fator para a dispersão de doenças e parasitos que estes animais albergam. Uma grande variedade de parasitos podem acometer os canídeos em geral, porém alguns helmintos apresentam maior importância médica e veterinária devido à sua prevalência, patogenicidade e capacidade de infectar ou causar doenças no homem (Pennisi et al. 1994; Guillot & Bouree, 2007).

Dentre os helmintos com potencial zoonótico, destacam-se os dos gêneros *Ancylostoma* e *Toxocara*, e, possivelmente a espécie *Angiostrongylus vasorum*. A migração das larvas de *Toxocara* sp. no homem causa uma síndrome conhecida como Larva Migrans Visceral, que pode ser assintomática, subaguda ou aguda. A severidade do quadro clínico depende da quantidade de larvas presentes no organismo, do órgão parasitado e da resposta imune do paciente. Essa síndrome caracteriza-se por hipereosinofilia sanguínea, hepatomegalia e linfadenite. As larvas também podem atingir o sistema nervoso central, levando a manifestações neurológicas, e o globo ocular, levando a uma síndrome denominada Larva Migrans Ocular. A migração de larvas infectantes de *Ancylostoma* sp. na pele causa a Larva Migrans Cutânea, caracterizada por uma lesão eritemopapulosa que evolui assumindo aspecto vesicular e pelo rastro sinuoso formado durante a migração das larvas. Essas duas zoonoses parasitárias são bastante frequentes em regiões tropicais e subtropicais (Lima, 2011). Em relação a *A. vasorum*, embora ainda não tenha sido confirmada a infecção em humanos, alguns pesquisadores não descartam o seu potencial zoonótico (Eckert & Lammler 1972).

Nos cães, as parasitoses são frequentes e, geralmente, os animais apresentam um poliparasitismo por várias espécies de endo, ecto e hemoparasitos. Essas infecções podem causar alta morbidade nos animais, como perda de peso, anemia, baixa de resistência

imunológica, facilitando infecções secundárias e inclusive a morte dos animais (Vasconcellos 2006). Neste contexto podem-se citar as espécies de nematódeos *Angiostrongylus vasorum*, parasito cardio-pulmonar e *Ancylostoma caninum*, parasito intestinal de canídeos e felídeos. A importância da infecção por esses helmintos é reconhecida pelo crescente número de casos de *A. vasorum* na clínica veterinária e pelos desafios envolvidos no diagnóstico, além da alta morbidade e patogenicidade causada por esses parasitos nos cães.

## 2. ANGIOSTRONGYLUS

Dentre as dezessete espécies descritas no gênero *Angiostrongylus*, três possuem interesse médico e médico veterinário: *A. cantonensis*, *A. costaricensis* e *A. vasorum*. (Souza et al. 2009).

*A. cantonensis* é um parasito do sistema circulatório de roedores que pode atingir acidentalmente o homem, sendo a causa mais comum da meningite eosinofílica. As larvas migram para o sistema nervoso central, onde podem se desenvolver até a fase adulta, e a migração ou morte destes parasitos desencadeia um processo inflamatório. Os sintomas mais comuns são dor de cabeça, náuseas e febre. (Alicata 1988; Sawanyawisuth, 2009; Lui et al. 2011).

*A. costaricensis* é um parasito do plexo mesentérico de roedores que ao infectar acidentalmente o homem causa a angiostrongilose abdominal das Américas. Muitas vezes a infecção pode ser assintomática ou apresentar sintomas leves, e em casos mais severos, pode-se observar dor abdominal intensa, comprometimento vascular, infiltrado inflamatório, trombose e necrose. Complicações como peritonite por perfuração intestinal, úlceras e hemorragias podem ocorrer. (Incani, 2007; Rodriguez et al. 2008).

*A. vasorum* é um parasito da artéria pulmonar e suas ramificações e do ventrículo direito de canídeos domésticos (*Canis familiaris*) e silvestres como raposa do Saara (*Fennecus zerda*) (Rosen et al. 1970), raposa do campo (*Dusicyon vetulus*) (Lima et al. 1994) e chacal (*Canis aureus*) (Bolt et al. 1994). Animais de outras famílias como o texugo (*Meles meles*) (Torres et al. 2001), lontra (*Lutra lutra*) (Torres et al., 2004) e furão (*Mustela putorius*) (Bourque et al. 2005) já foram descritos com infecções naturais. Segundo Costa et al. (2003) a posição sistemática de *A. vasorum* pertence a:

**Filo** Nematoda  
**Ordem** Strongylida  
**Superfamília** Metastrongyloidea  
**Família** Protostrongylidae  
**Subfamília** Angiostrongylinae  
**Gênero** *Angiostrongylus*  
**Espécie** *Angiostrongylus vasorum*

## 2.1 Morfologia

Morfologicamente, a espécie é caracterizada por apresentar o corpo delgado e alongado, ligeiramente atenuado nas extremidades, coloração esbranquiçada ou rósea quando recém colhidos. A cutícula é fina e transparente, podendo-se perceber o aspecto helicoidal dos órgãos genitais em torno do tundo digestivo, contrastando sua coloração esbranquiçada com a tonalidade rósea ou acinzentada do intestino. Apresenta uma ligeira dilatação na cutícula da extremidade cefálica, abertura bucal pequena e ovalada e apresentando seis papilas peribucais. O poro excretor situa-se ventralmente abaixo da união do esôfago e intestino. Os machos apresentam tamanho médio de 13 mm de comprimento e de 0,24 mm de largura e a extremidade posterior levemente recurvada ventralmente, com presença de bolsa copuladora e raios bursais evidentes. As fêmeas são maiores e mais robustas, com média de 17 mm de comprimento e de 0,26 mm de largura, a cauda é curta e apresentam uma expansão cuticular em forma de bainha que se projeta além da cauda. A larva de primeiro estágio (L1) possui a extremidade anterior arredondada, com cutícula transparente, a cauda é fina e apresenta um apêndice unguiforme. A larva de terceiro estágio (L3) apresenta um par de estiletos quitinizados dispostos longitudinalmente na região anterior. A cauda é levemente recurvada e apresenta um apêndice digitiforme (Lima et al. 1985; Costa et al. 2003).

## 2.2 Ciclo Biológico

As larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo e, no ambiente, estas podem permanecer no bolo fecal ou atingir coleções de água nas quais moluscos podem se infectar dando continuidade ao ciclo. Moluscos terrestres ou aquáticos podem ser hospedeiros intermediários e infectam-se via trato digestivo ou pela penetração



ativa das L1 através do tegumento. Nos tecidos do molusco, a L1 sofre duas mudas e origina larva de segundo estágio (L2) e larva de terceiro estágio (L3), que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Thiengo, 1996). A infecção do hospedeiro vertebrado, principalmente canídeos domésticos e silvestres, ocorre pela ingestão da L3. Embora os cães não tenham o hábito de se alimentarem de moluscos, a ingestão pode ocorrer de forma acidental, junto com a água de ribeirões ou grama, por exemplo, (Bessa, 1996). A ingestão de hospedeiros paratênicos, tais como roedores e anfíbios também pode ser fonte de infecção (Bolt et al. 1993).

Após a ingestão das larvas infectantes, estas penetram na parede do trato digestivo e migram até os linfonodos mesentéricos onde, por volta do terceiro dia de infecção, ocorre a muda de L3 para larva de quarto estágio (L4) e adulto imaturo. Estes alcançam a corrente sanguínea e, aproximadamente no décimo dia de infecção, podem ser encontrados no ventrículo e nas artérias pulmonares. Por volta do trigésimo dia de infecção os helmintos atingem a maturidade sexual nas artérias pulmonares, onde ocorre a cópula e início da postura de ovos não embrionados pelas fêmeas. Nas arteríolas pulmonares ocorre o embrionamento dos ovos e desenvolvimento das larvas de primeiro estágio (L1) que eclodem, passam ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios e podem ser expelidas junto a secreções pulmonares ou então serem deglutidas e eliminadas juntamente com as fezes. (Bwangamoi, 1974; Mahaffey, 1981; Patterson et al. 1993).

### **2.3 Distribuição Geográfica**

O *A. vasorum* apresenta distribuição cosmopolita e as regiões do mediterrâneo, Irlanda, Alemanha, sudoeste da França e sudoeste da Inglaterra são as principais áreas enzoóticas desse nematódeo. (Poli et al. 1984; Roche & Kelliher, 1968; Dodd, 1973; Jacobs & Prole, 1975; Lynch, 1977; Williams, 1985; Martin et al. 1993; Simpson & Neal, 1982; Cobb & Fisher, 1990; Simpson, 1996). O primeiro relato do parasito foi feito na França por Serres (1854), que relatou o encontro do nematódeo no sistema circulatório de um cão que morreu subitamente e foi necropsiado na cidade de Toulouse. A partir de então, relatos desse helminto parasitando cães ou canídeos silvestres vêm sendo catalogados em regiões da Austrália (Roberts, 1940), Espanha (Acedo et al. 1979; Segovia et al. 2001), Itália (Poli et al. 1984; Traversa et al. 2008), Dinamarca (Willingham, 1996; Saeed, 2006), Canadá (Perry et al. 1991) e África (Bwangamoi, 1972).

No Brasil, o primeiro relato do parasito foi feito por Travassos em 1927, que recuperou do ventrículo direito e da artéria pulmonar exemplares do nematódeo, que o autor identificou como *Haemostromylus raillet* (= *A. vasorum*), em cachorros do mato (*Cerdocyon thous azarae*) provenientes do município do Rio de Janeiro – RJ. Gonçalves, em 1961, registrou pela primeira vez cães domésticos naturalmente infectados por *A. vasorum* no Brasil, no Rio Grande do Sul. Posteriormente, foram relatados casos em Salvador (Fehringer & Fiedler 1977) e no estado do Paraná (Giovanonni et al. 1985). Em 1985, Lima et al. recuperaram larvas L1 das fezes de dois cães adultos naturalmente infectados provenientes do município de Caratinga – Minas Gerais. Na necropsia foram recuperados espécimes adultos de *A. vasorum* das artérias pulmonares e ramificações dos dois cães. Esse foi o primeiro relato do parasito no estado de Minas Gerais.

Em 1994, Lima et al. relataram a infecção natural por *A. vasorum* em quatro raposas do campo (*Dusicyon vetulus*) provenientes do sul do estado de Minas Gerais, mantidas no zoológico de Belo Horizonte. A infectividade das larvas encontradas foi testada pela infecção em moluscos *Biomphalaria glabrata* e posteriormente em cães. Em 2007, Duarte et al. relatam a primeira infecção natural de *A. vasorum* em *Cerdocyon thous* no estado de Minas Gerais e estudaram aspectos da ecologia do parasito nessa população de hospedeiros. Durante a necropsia, foram recolhidos 24 exemplares de *A. vasorum* dos pulmões e átrio direito do coração de seis espécimes, provenientes do município de Juiz de Fora.

## **2.4 Quadro clínico e patologia**

Os fatores que determinam a patogenia podem estar relacionados com a localização do parasito no hospedeiro. Algumas alterações observadas durante a infecção ocorrem devido à presença dos parasitos adultos, larvas de primeiro estágio e ovos nas artérias de pequeno e médio calibre do pulmão, que podem desencadear pontos de inflamação local e formação de granulomas (Cury et al. 2005).

Os animais podem apresentar sinais clínicos como emagrecimento, mucosas pálidas, tosse seca persistente, dispnéia, congestão pulmonar, broncopneumonia hemorrágica, taquicardia, arritmias, quadros de trombose, coagulação intravascular disseminada e morte do animal (Jones et al. 1980; Mahaffey et al. 1981; Patterson et al. 1993; Cury & Lima 1996; Ramsey et

al. 1996; Costa & Tafuri 1997; Cury et al. 2002). Apesar das profundas alterações e variedade de sinais clínicos produzidas no hospedeiro definitivo em decorrência do parasitismo por *A. vasorum*, os mecanismos de tais processos não são totalmente compreendidos.

### 3. ANCYLOSTOMA CANINUM

O *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) é um nematódeo que parasita o intestino delgado de felídeos e canídeos domésticos e silvestres, alimentando-se de sangue do hospedeiro. Pode infectar acidentalmente o homem, causando a larva migrans cutânea, síndrome caracterizada por lesões eritemato-papulosa e uma dermatite serpigínea e pruriginosa (Lima, 2011).

Segundo Yamaguti (1961), sua classificação é:

**Filo** Nematoda

**Subclasse** Secernentea

**Ordem** Strongylidae

**Família** Ancylostomidae

**Gênero** *Ancylostoma*

**Especie** *Ancylostoma caninum*

#### 3.1 Morfologia

O *A. caninum* possui uma cápsula bucal com três pares de dentes na margem ventral, anteriormente há um par de dentes triangulares dorsais e um par de dentes ventro-laterais. As fêmeas apresentam a abertura do aparelho genital localizada próxima à interface do segundo com o terceiro terço do corpo e os ovários encontram-se dispostos enrolados em torno do tubo digestivo. Os ovos medem 55 – 72,5 µm de comprimento por 34 – 44,7µm de largura. Os machos possuem gubernaculo e os espículos variam de 0,73 a 0,96mm (Burrows, 1962).

#### 3.2 Ciclo Biológico

As fêmeas produzem ovos não embrionados que são eliminados junto com as fezes do hospedeiro definitivo infectado. No ambiente, em condições favoráveis para se desenvolverem como oxigenação, umidade e temperaturas adequadas, num período de 24 a 48

horas, ocorre o embrionamento dos ovos que originam uma larva rabditóide de primeiro estágio (L1). Essa se alimenta de matéria orgânica e microorganismos e sofre duas mudas para larva de segundo estágio (L2) e posteriormente para larva de terceiro estágio (L3) (Loukas et al. 2005). A L3 não se alimenta mais no solo e migra para o topo de folhas da vegetação de modo a maximizar as possibilidades de encontrar um novo hospedeiro. Após o contato com a pele, a larva penetra ativamente pelos folículos pilosos. A maioria das infecções é por penetração ativa embora também possa ocorrer infecção oral (Loukas et al. 2005). Após a penetração no hospedeiro, as larvas voltam a se alimentar e a se desenvolver. Elas são passivamente transportadas para a micro-circulação pulmonar, passam pelo sistema respiratório e são deglutidas. Durante essa rota ocorre a muda para larva de quarto estágio (L4). Ao alcançarem o intestino delgado, ocorre a maturação do parasito, a fixação nas mucosas intestinais, início da alimentação e postura de ovos pelas fêmeas (Loukas et al. 2005).

Eventualmente as L3 podem atingir a circulação sistêmica e se dispersarem pelos tecidos (migração somática), ficando instaladas em fibras musculares esqueléticas como larvas em latência. (Cury et al. 2002). Essas larvas em latência podem promover infecções transplacentárias e transmamárias, as quais são influenciadas por mudanças hormonais durante o parto. Esse fato tem relevância epidemiológica muito elevada, uma vez que a incidência dessa parasitose é muito maior em filhotes do que em cães adultos (Kalkofen, 1987; Oliveira-Siqueira et al. 2002).

### **3.3 Distribuição geográfica**

*A. caninum* apresenta distribuição mundial, sendo encontrado nos cinco continentes (Provic & Croese, 1996; Loukas & Provic, 2001, Popiolek, 2007; Yacob et al. 2007; Cantó et al. 2011). No Brasil diversos estudos têm sido realizados para estimar a prevalência do *A. caninum* em animais e outros têm sido direcionados para avaliar a contaminação do solo por esse parasito em locais públicos, onde o risco da transmissão zoonótica é maior. Araujo et al. (1998) relataram que em 74 praças publicas examinadas em Campo Grande - MS, 42 (56,8%) delas estavam contaminadas com ovos de ancilostomídeos. Em 2005, um estudo conduzido por Guimarães et al. em praças do estado de Minas Gerais, mostrou uma prevalência de 69,6% (16/23) de ovos de ancilostomídeos nas amostras de solo e de 58% (101/174) nas amostras de fezes. Em 2010, Kimpel et al., estudando endoparasitos em cães da zona urbana de Fortaleza, recuperaram 3.162 espécimes de quatro espécies de helmintos. Entre eles *A. caninum* com

uma prevalência de 95,7%. Coelho et al. (2011) relataram uma prevalência de 66,3% em 33 cães analisados na cidade de Andradina, Estado de São Paulo.

Alguns autores relatam que a prevalência e intensidade das infecções podem variar de forma considerável com relação aos fatores regionais e locais, podendo ser influenciada pelo clima, composição do solo e condição socioeconômica (Mabaso, et al. 2003; Tomono et al. 2003; Traub et al. 2005).

### **3.4 Quadro clínico e patologia**

Ao se alojarem no intestino delgado do hospedeiro definitivo, os vermes adultos fixam-se à mucosa por meio da capsula bucal e iniciam intensa espoliação sanguínea. Diversas patologias, destacando-se anemias, hemorragias e lesões intestinais como ulcerações são conseqüências diretas do comportamento de alimentação do parasito (Provic & Croese, 1990; Loukas & Provic, 2001). Essas alterações ocorrem com mais freqüência em cães jovens, ao passo que animais adultos costumam apresentarem-se assintomáticos. Outras manifestações clínicas frequentemente observadas no parasitismo por *A. caninum* são apatia, perda de peso, diarreias, vômitos e infecções bacterianas secundárias.

## **4. RESPOSTA DO HOSPEDEIRO FRENTE A INFECÇÃO POR *A. vasorum* E *A. caninum***

Alguns estudos foram conduzidos na tentativa de elucidar o papel dos leucócitos durante a infecção por *A. vasorum* em cães. Entretanto, os resultados observados não foram conclusivos e o real papel dessas células na resposta contra o parasito ainda não foi bem esclarecido. Mishra & Cens (1971), Mingaud et al. (1992) e Bourdeaux (1993) citam a eosinofilia como um importante achado na angiostrongilose canina, sendo que três picos bem definidos dessa alteração celular podem ser observados no início das infecções e são relacionados à passagem do parasito pelos linfonodos mesentéricos, muda para 4º estágio e maturidade sexual. Cury (1999) ressaltou que além da eosinofilia um aumento do número absoluto de neutrófilos bastonetes na circulação de cães experimentalmente infectados pode ser observado. Também há relatos de monocitose durante a infecção (Koch e Jensen, 1992; Mingaud et al. 1992, Barçante, 2004).

Em relação à resposta imune humoral, um aumento nos níveis de IgM, IgG, IgE e IgA no sangue periférico dos animais ocorre até aproximadamente o 60º dia pós infecção (DPI) em cães infectados. A partir dos 60º dpi, os valores se estabilizaram e se mantêm constantes na fase crônica da infecção (Barçante 2004). Pouco se sabe também em relação à citocinas produzidas em resposta aos antígenos do parasito durante o curso da infecção.

Na infecção por ancilostomídeos, a resposta imune celular gerada é mista, com uma produção significativa de citocinas típicas de uma resposta do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) e Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) (Pit et al., 2001; Geiger et al., 2004; Quinnell et al., 2004). Assim como na angiostrongilose, a eosinofilia é um fator marcante durante a infecção por *A. caninum*, sendo predominante na resposta inflamatória as L3 nos tecidos e durante a sua migração até chegar ao pulmão (Loukas & Provic, 2001). Alguns autores relatam que essa eosinofilia é capaz de matar larvas em estágios infectantes, mas não os parasitos adultos (Meeusen, 2000). Leucocitose também pode ser observada em cães com uma grande carga parasitária (Carroll & Grove, 1984). Entretanto, apesar da resposta imune sistêmica observada durante a infecção, sabe-se que a resposta celular pode ser suprimida pelos antígenos excretados/secretados do parasito (Guimarães-Gazzinelli, 2010).

A resposta imune humoral é marcada por um aumento nos níveis de IgM, IgG, IgE e IgA (Loukas & Provic, 2001) no sangue periférico de cães, sendo que os níveis de IgM são mais expressivos nas primeiras semana de infecção e IgG é detectado mais tardiamente e permanecem em níveis mais elevados durante a fase crônica da infecção. IgE é relatado como uma imunoglobulina que confere resistência à infecção, assim como IgA, e os níveis de IgA são mínimos e aparecem em altos títulos apenas em infecções graves (Carroll et al. 1984; Hotez et al. 2002).

## 5. JUSTIFICATIVA

*Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum* são parasitos de ampla distribuição geográfica e apresentam importante papel tanto no aspecto da clínica veterinária como da saúde pública, uma vez que causam grande morbidade nos cães e podem ser causadores de zoonoses. Aliado a essa importância e ao conhecimento de que os cães raramente são parasitados por um único helminto, estudos da dinâmica da coinfeção, de aspectos biológicos e imunológicos são necessários para se conhecer esta interação e fornecer subsídios para o estabelecimento de medidas de controle e profilaxia.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo geral

Avaliar os aspectos parasitológicos, hematológicos e imunológicos de cães com coinfeção por *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum*, e avaliar se a infecção por *A. caninum* altera esses parâmetros em cães já infectados por *A. vasorum*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Avaliar os aspectos parasitológicos de cães infectados com *A. vasorum* e *A. caninum*.
- Avaliar as alterações hematológicas decorrentes da infecção por *A. vasorum* e *A. caninum*.
- Avaliar *in vitro* a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico dos cães infectados frente a estímulos de antígeno bruto de parasitos adultos de *A. vasorum* e *A. caninum*.
- Identificar as citocinas plasmáticas e as citocinas produzidas *in vitro* pelas células mononucleares do sangue periférico dos animais infectados com *A. vasorum* e *A. caninum*.
- Observar o perfil da resposta imune humoral em cães com angiostrongilose canina infectados experimentalmente com L3 de *A. caninum*.



## **7. MATERIAL E MÉTODOS**

### **7.1 Parasitos**

Foram utilizadas as espécies *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) e *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) Hall, 1913. A cepa de *A. vasorum* utilizada foi isolada de um cão naturalmente infectado proveniente do município de Caratinga / MG (Lima et al., 1985), que é mantida por sucessivas infecções em cães do Canil de Experimentação do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG) e em moluscos *Biomphalaria glabrata*, mantidos no moluscário do Departamento de Parasitologia (ICB – UFMG). A cepa de *A. caninum* foi isolada de um cão naturalmente infectado proveniente do município de Belo Horizonte - MG em 2005 e vem sendo mantida em laboratório por sucessivas infecções em cães do Canil de Experimentação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB – UFMG).

### **7.2 *Angiostrongylus vasorum***

#### **7.2.1 Obtenção de larvas de primeiro estágio (L1)**

Para obtenção das larvas de primeiro estágio, amostras de fezes dos cães experimentalmente infectados e mantenedores da cepa, foram coletadas e submetidas ao método de Baermann modificado, que é constituído por um funil de vidro medindo 15 cm de diâmetro conectado a um tubo de hemólise através de um tubo de látex. As fezes foram enroladas em gaze e colocadas dentro do funil, completado com água a 41°C.

Após 24 horas, o tubo de hemólise foi retirado do aparelho de Baermann, centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspensão em 5 mL de água desclorada. Este procedimento de lavagem foi repetido três vezes. O material foi homogeneizado com pipeta de pasteur, e três alíquotas de 10 µl foram retiradas para a contagem de larvas em microscópio estereoscópio (25X). O número de L1 por mL foi estimada por regra de três simples, utilizando à média das três alíquotas retiradas. As larvas obtidas foram utilizadas para infecção de moluscos.

### **7.2.2 Obtenção de larvas de terceiro estágio (L3)**

Para a obtenção das larvas de terceiro estágio de *A. vasorum* foram utilizados *Biomphalaria glabrata*, criados no moluscário do Departamento de Parasitologia (ICB – UFMG). Os moluscos foram colocados individualmente em poços de placa de cultura de células com seis poços de 3,5 cm de diâmetro (TPP—Techno Plastic Products, Suíça) juntamente com uma alíquota de 1000 L1 de *A. vasorum* ressuspensas em 3 mL de água desclorada. As placas foram tampadas e colocadas sob foco de luz (lâmpada de 60-watts) a uma distância de 30 cm por 24 horas. Após esse período, os moluscos permaneceram dentro das placas por mais 24 horas sem o foco de luz e então foram transferidos para cubas plásticas, contendo aproximadamente 1500 mL de água desclorada. A cuba foi mantida em temperatura ambiente e a higienização realizada semanalmente. Os caramujos foram alimentados com folhas de alface. Após o 25º dia de infecção, os caramujos foram macerados em placa de petri com bastão de vidro, colocados em gaze cirúrgica e submetidos ao método de Baermann, para a recuperação das larvas, seguindo a mesma metodologia utilizada para obtenção de L1. As L3 recuperadas foram utilizadas para infecção dos cães.

### **7.2.3 Obtenção de parasitos adultos de *A. vasorum***

Para a recuperação de parasitos adultos, foram utilizados dois cães, sem raça definida, com 12 meses de idade, infectados individualmente, por via oral, com 300 L3 por quilo de peso vivo. A partir do 30º dia pós infecção, fezes de cada cão foram coletadas diariamente para realização do exame de Baermann e para a determinação do período pré patente (PPP) da infecção. Após 60 dias de infecção os cães foram submetidos à eutanásia conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA) e em concordância com a Lei n. 6.638 de 8 de maio de 1979 que estabelece normas práticas Didático-Científico da vivisseção de animais (Anexo I). Todos os procedimentos relacionados à eutanásia, necropsia e coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) (Anexo II) e realizados por um Médico Veterinário.

Na necropsia, realizou-se a retirada do conjunto cardíaco-pulmonar, que foi colocado em um pirex de vidro contendo salina 0,85%. As artérias pulmonares e suas ramificações e o ventrículo direito do coração foram abertos com o auxílio de tesoura de ponta fina. Os

parasitos encontrados foram coletados com auxílio de um estilete e colocados em uma placa de Petri contendo salina 0,85%. Posteriormente, os parasitos recuperados foram identificados, contados, lavados em PBS estéril, colocados em tubo eppendorf e congelados à temperatura de – 20° C, para utilização no preparo de antígenos, usados nos testes imunológicos.

### **7.3 *Ancylostoma caninum***

#### **7.3.1 Obtenção de larvas de terceiro estágio (L3)**

Para obtenção das larvas de terceiro estágio foram realizadas coproculturas, utilizando fezes de cães infectados e mantenedores da cepa. As amostras fecais foram misturadas a vermiculita para aeração do meio e incubadas em estufa a 27°C por 10 dias. Após esse período o material foi colocado no aparelho de Baermann por 24 horas, como descrito anteriormente. O tubo de hemólise foi retirado, as L3 foram identificadas e contadas utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente para contagem das larvas de *A. vasorum*. Posteriormente, as larvas recuperadas foram utilizadas na infecção dos cães.

#### **7.3.2 Obtenção de parasitos adultos de *A. caninum***

Para a recuperação de *A. caninum* adultos, foram utilizados dois cães, sem raça definida, com 12 meses de idade, infectados individualmente, por via oral, com 300 L3 por quilo de peso vivo. A partir do 13º dia pós infecção, fezes de cada cão foram coletadas diariamente para a pesquisa de ovos, baseando-se na técnica de Gordon e Whitlock (1939), e então determinação do período pré patente da infecção. Após 30 dias de infecção os cães foram submetidos à eutanásia nas mesmas condições e conformidades descritas anteriormente no item 7.2.3.

Após a abertura da cavidade abdominal, o intestino delgado foi isolado dos demais órgãos, retirado e colocado em um pirex de vidro contendo salina 0,85%. O intestino foi aberto com o auxílio de tesoura de ponta fina, os helmintos foram coletados com auxílio de estilete e colocados em uma placa de Petri contendo salina 0,85%. Posteriormente, foram identificados, contados, lavados em PBS estéril, colocados em tubo eppendorf e congelados à temperatura de – 20° C, para utilização no preparo de antígenos, usados nos testes imunológicos.

#### **7.4 Seleção dos animais, divisão dos grupos e infecções experimentais**

Para avaliar os parâmetros parasitológicos, hematológicos e imunológicos da infecção por *A. vasorum* e da coinfeção por *A. vasorum* e *A. caninum* em cães experimentalmente infectados, foram utilizados 19 cães sem raça definida, de ambos os sexos, com uma média de 22 meses de idade. Os cães foram mantidos no Canil de Experimentação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG) conforme as normas de bem estar animal e de acordo com o comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG).

Para certificar a inexistência de infecções helmínticas antes do início do experimento, foram realizados exames de fezes em todos os cães. Em seguida foram vermifugados com duas doses de anti-helmíntico polivalente a base de 500 mg de fembendazol, 144 mg de pamoato de pirantel e 50 mg de praziquantel. (Strondal Plus® – Indulbras) com intervalo de 21 dias entre as doses. Após as vermifugações, três exames de fezes foram realizados em intervalos de três dias, pelo método de sedimentação espontânea e Baermann, para pesquisa de ovos e larvas de helmintos pulmonares ou intestinais.

Dos 19 cães utilizados neste experimento, 10 animais foram infectados com 100 L3 de *A. vasorum* por quilo de peso vivo e acompanhados durante 120 dias para observação do período pré-patente e início da fase crônica da infecção. Quando os animais atingiram a fase crônica, foram divididos em dois grupos: Grupo B e Grupo C, ambos com cinco cães. Os nove animais restantes foram distribuídos nos grupos A, com quatro cães e D com cinco cães. O Quadro 1 mostra a divisão dos cães nos grupos.

Quadro 1: Divisão e identificação dos cães por sexo e grupo experimental

| Grupo | Descrição   | Animal | Sexo  |
|-------|---|--------|-------|
| A     | Cães não infectados   | 1A     | Fêmea |
|       |   | 2A     | Fêmea |
|       |   | 3A     | Fêmea |
|       |   | 4A     | Fêmea |
| B     | Cães com angiostrongilose crônica (a partir de 120 dias de infecção)                            | 1B     | Macho |
|       |   | 2B     | Fêmea |
|       |   | 3B     | Fêmea |
|       |   | 4B     | Fêmea |
|       |   | 5B     | Fêmea |
| C     | Cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com <i>Ancylostoma caninum</i>           | 1C     | Macho |
|       |   | 2C     | Macho |
|       |   | 3C     | Macho |
|       |   | 4C     | Macho |
|       |   | 5C     | Macho |
| D     | Cães infectados simultaneamente com <i>Angiostrongylus vasorum</i> e <i>Ancylostoma caninum</i> | 1D     | Fêmea |
|       |   | 2D     | Fêmea |
|       |   | 3D     | Fêmea |
|       |   | 4D     | Fêmea |
|       |   | 5D     | Fêmea |

A infecção de cada grupo foi realizada como descrito abaixo:

**Grupo A:** quatro cães que não foram infectados – controle negativo.

**Grupo B:** cinco cães infectados via oral com 100 L3 de *A. vasorum* por quilo de peso vivo. As larvas previamente contadas e separadas foram misturadas a patê canino e oferecidas aos cães. A partir do 120º dia pós-infecção, foi considerado o início da fase crônica da angiostrongilose canina.

**Grupo C:** cinco cães infectados via oral com 100 L3 de *A. vasorum* por quilo de peso vivo. As larvas previamente contadas e separadas foram misturadas a patê canino e oferecidas aos cães. No 120º dia após a infecção com as larvas de *A. vasorum*, os cães foram infectados com 100 L3 de *A. caninum* por quilo de peso vivo seguindo a mesma metodologia anterior.

**Grupo D:** cinco cães infectados simultaneamente com 100 L3 de *A. vasorum* e 100 L3 de *A. caninum* por quilo de peso vivo. As larvas previamente contadas e separadas foram misturadas a patê canino e oferecidas aos cães.

Durante todo o período experimental, os cães foram mantidos em celas individuais cimentadas. A higienização e limpeza das celas foram realizadas diariamente. Os cães foram alimentados com ração comercial (Dog Show Gourmet – Nutriara Rações) de acordo com a indicação do fabricante e água fresca foi mantida à vontade.

### **7.5 Acompanhamento parasitológico dos cães**

O período experimental foi de 240 dias, dividido em duas fases de acompanhamento dos cães. A primeira fase (primeiros 120 dias) consistiu na infecção dos cães dos Grupos B e C e acompanhamento desses animais até atingirem a fase crônica da infecção. A segunda fase (120 seguintes) consistiu na infecção dos cães dos grupos C e D. Durante essa etapa os acompanhamentos parasitológico, hematológico e imunológico de todos os cães foram realizados.

O acompanhamento parasitológico dos cães foi realizado pelas contagens de ovos e larvas eliminados por gramas de fezes (OPG e LPG). As amostras de fezes foram coletadas da cela de cada cão, armazenadas em sacos plásticos identificados e transportadas ao laboratório de Helmintologia Veterinária onde foram analisadas.

O acompanhamento do número de ovos eliminados nas fezes foi realizado baseando-se na técnica de Gordon e Whitlock (1939) modificada. Após a coleta das fezes, quatro gramas foram pesadas e misturadas a 15 mL de água mais 45 mL de solução de NaCl saturada. O material foi homogeneizado com bastão de vidro e passado por uma malha. Com uma pipeta de pasteur o material filtrado foi novamente homogeneizado, colocado em câmara de McMaster e analisado em microscópio óptico (10x). Os ovos foram contados e o número final encontrado multiplicado por 50 para estimar o número total de ovos de *A. caninum* eliminados por grama de fezes.

Para acompanhamento do número de larvas eliminadas nas fezes, 100 gramas de fezes foram pesadas e colocadas no aparelho de Baermann para recuperação das L1, segundo metodologia

já descrita no item 7.2.1. Após homogeneização do sedimento do tubo de hemólise retirado do aparelho de Baermann, três alíquotas de 10 µl foram retiradas para as contagens de larvas em microscópio estereoscópio. A quantidade de L1 por mL foi estimada por regra de três simples, utilizando à média das três alíquotas retiradas anteriormente. O valor encontrado foi dividido por 100 (peso das fezes) para se obter o número de larvas eliminadas por grama de fezes.

A realização dos exames parasitológico foi realizada como descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Acompanhamento parasitológico nos grupos de cães sem infecção (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *Ancylostoma caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *Angiostrongylus vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) durante 120 dias de acompanhamento experimental.

| <b>Grupo</b> | <b>Exames parasitológicos realizados</b> | <b>Intervalo entre os exames</b> |
|--------------|--|----------------------------------|
| <b>A</b>     | Contagens de OPG e LPG                   | 30 dias                          |
| <b>B</b>     | Contagens de LPG                         | Três dias                        |
| <b>C</b>     | Contagens de OPG e LPG                   | Três dias                        |
| <b>D</b>     | Contagens de OPG e LPG                   | Três dias                        |

## **7.6 Avaliações hematológicas**

Durante a segunda fase do experimento, nove coletas de sangue (amostras de 5 mL) foram colhidas de cada cão para a avaliação hematológica com intervalos de 14-14 dias.

As amostras foram coletadas de cada cão por meio de punção venosa, em tubos com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% e foram divididas e processadas para se obter o hemograma completo, confecção de esfregaços sanguíneos para contagem diferencial de leucócitos e obtenção de plasma para exames imunológicos. As amostras foram divididas da seguinte forma:

Para realização do hemograma completo, 1 mL da amostra de sangue de cada animal foram acondicionadas em isopor com gelo, enviadas ao laboratório de Imunopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto e analisadas em contador hematológico veterinário automático (Modelo BC 2800 VET - Mindray).

Para confecção do esfregaço sanguíneo, uma gota de sangue foi colocada sobre lâmina de vidro. Com o auxílio de outra lâmina, em um ângulo de 45°, foi feito o esfregaço e corado como kit de coloração Panótico Rápido (Panótico Rápido LB. Laborclin). Com o esfregaço sanguíneo foram realizadas as contagens diferenciais de linfócitos, monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos. Duas contagens de 100 células foram realizadas em campos diferentes do esfregaço e a média desses valores foi obtida.

Para obtenção do plasma os 4 mL restantes da amostra coletada de cada cão foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 300 µL foram separadas e armazenadas a -80 °C para posterior utilização na identificação de citocinas e anticorpos presentes na circulação.

### **7.7 Aferição do peso corporal**

Quinzenalmente foram realizadas as aferições do peso corporal de cada cão do experimento, inclusive dos cães não infectados. Os cães foram contidos fisicamente e a pesagem individual foi realizada em balança digital (Glass 200 Digital - G-Tech).

### **7.8 Preparação de antígeno bruto solúvel de *A. vasorum* e *A. caninum***

Para produção de antígeno bruto solúvel, 120 parasitos adultos de *A. vasorum* e 100 de *A. caninum* foram colocados separados em gral de porcelana e macerados mecanicamente com PBS estéril. Após completa a maceração, o material foi sonificado (potência de 20 W, frequência de 20 ondas ultrasonográficas por segundo, amplitude 4, potência máxima) em aparelho de ultra-som em 05 ciclos de 1 minuto com intervalos de 1 minuto. Durante todo o processo, os tubos contendo *A. vasorum* e *A. caninum* foram mantidos em banho de gelo. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos. O sedimento descartado e o sobrenadante, filtrado em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®). A quantidade de proteínas nas preparações antigênicas foi dosada pelo uso de kit comercial BCA (Pierce BCA



kit, Pierce, USA), realizado conforme as instruções do fabricante. Alíquotas de 300 µL dos antígenos brutos prontos foram armazenadas a - 20 °C até o seu uso.

## **7.9 Resposta imune celular e humoral**

### **7.9.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico**

Os pontos escolhidos para a separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram determinados com base na data das infecções dos cães. O grupo A foi avaliado no 80º dia de acompanhamento, o Grupo B no 120º DPI, Grupo C no 150º DPI e Grupo D no 80º PDI. Foram coletados 20 mL de sangue de cada cão em tubos a vácuo heparinizados para separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).

As amostras de sangue foram transferidas individualmente para tubos de 50 mL de polipropileno (Falcon 2074, BD Biosciences, EUA) identificados, e lentamente sobre o sangue, foram colocados 10 mL de solução de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1.077, Sigma, EUA). Os tubos foram centrifugados a 1200 rpm por 40 minutos em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, formado na interface entre plasma e eritrócitos, foi coletado, transferido para outro tubo de 50 mL e lavado por duas vezes a 1200 rpm por 10 minutos com meio RPMI 1640 (Sigma, EUA).

Ao final, as células foram ressuspensas para 1 mL de meio RPMI, e a contagem das mesmas foi feita em câmara hemocitométrica de Neubauer, na diluição de 1:20 em Solução de Azul de Turks (Sigma, EUA). O número total de células por mL foi obtido por média do número de células nos quatro quadrantes x 20 (fator de diluição) x 10<sup>4</sup> (fator de correção da câmara).

As PBMCs separadas foram utilizadas no ensaio de proliferação celular, na determinação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura celular e na fenotipagem de leucócitos por citometria de fluxo – *ex vivo*. O plasma que também foi separado durante a centrifugação com Ficoll-Hypaque foi coletado e armazenado a -80°C, para posterior utilização na identificação de citocinas e anticorpos anti-*A. vasorum* e anti-*A. caninum*.

### **7.9.2 Ensaio de proliferação celular**

A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de MTT (Sigma, EUA) utilizando células mononucleares do sangue periférico, obtidas como descrito no item 7.9.1, de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupo D).

Aproximadamente 250.000 PBMCs de cada cão foram incubadas separadamente em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, com meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Invitrogen, EUA), 1,6% de L-Glutamina (Synth, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, Brasil) durante 72 horas na presença e ausência dos antígenos na concentração de 25µg/mL, em placas de cultura de fundo chato de 96 poços.

Após a incubação, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, e a placa incubada por mais 4 horas na mesma condição descrita anteriormente. Após esse período de reação, o sobrenadante foi retirado e substituído por 100 µL de DMSO 10% (Merk, Alemanha), seguido de agitação intensa com pipeta multicanal.

A densidade óptica para cada amostra foi determinada a 570 nm em leitor de placas de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA), e a proliferação celular foi expressa em relação à porcentagem da absorbância de culturas estimuladas com antígenos dos parasitos após subtração da absorbância de culturas não estimuladas.

### **7.9.3 Determinação da produção de citocinas no plasma de cães e em sobrenadantes de culturas**

Para determinar a produção de citocinas e um padrão da resposta imune dos cães durante a infecção por *A. vasorum* e *A. caninum*, plasma e sobrenadante de culturas com células mononucleares do sangue periférico foram analisados pelo teste imunoenzimático ELISA. Para tal finalidade foram avaliadas algumas citocinas que promovem uma proliferação de células do tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23p40 e IFN- $\gamma$ ) e do tipo Th2 (IL-4 e IL-10).

Os pontos escolhidos para a avaliação das citocinas foram determinados com base na data das infecções dos cães e início do período pré-patente das infecções. Para os grupos A e B, foram escolhidos apenas um ponto de avaliação. Para o grupo C, dois pontos e para o grupo D, três. Os dias da avaliação, aspectos avaliados e o material analisado, estão representados no Quadro 3.

Quadro 3: Grupo dos cães utilizados no experimento, ponto de avaliação, aspecto avaliado e dia pós infecção para a dosagem das citocinas no plasma e em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico dos cães:

| <b>Grupo</b> | <b>Pontos de avaliação</b> | <b>Aspecto avaliado</b>   | <b>DPI</b> | <b>Material analisado</b> |
|--------------|----------------------------|---|------------|---------------------------|
| <b>A</b>     | 1                          | Cães com ausência de infecção helmíntica  | NA         | Plasma e sobrenadante     |
| <b>B</b>     | 1                          | Cães com angiostrongilose crônica   | 120        | Plasma e sobrenadante     |
| <b>C</b>     | 1                          | Cães com angiostrongilose crônica   | 120        | Plasma                    |
|              | 2                          | Cães com angiostrongilose crônica e infectados com <i>A. caninum</i> (após o início do PPP de <i>A. caninum</i> ) | 150        | Sobrenadante              |
| <b>D</b>     | 1                          | Cães com ausência de infecção parasitária   | NA         | Plasma                    |
|              | 2                          | Cães com angiostrongilose aguda e infectados com <i>A. caninum</i> (após o início do PPP de <i>A. caninum</i> )   | 30         | Plasma                    |
|              | 3                          | Cães com angiostrongilose aguda e infectados com <i>A. caninum</i> (após o início do PPP de <i>A. vasorum</i> )   | 80         | Sobrenadante              |

DPI= dias após infecção      NA= não aplicável

Para a detecção de citocinas presentes no plasma dos cães, foram utilizados plasmas obtidos nos dias determinados para análise, conforme metodologia descrita no item 7.6.

Para a análise do sobrenadante da cultura celular, foram utilizadas as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas como descrito no item 7.9.1. Aproximadamente 500.000 PBMCs foram incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 2% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Invitrogen, EUA), 1,6% de

L-Glutamina (Synth, Brasil) e 10% de Soro Fetal Bovino (Cutlab, Brasil) durante 72 horas na presença e ausência de antígeno bruto de *A. vasorum* ou *A. caninum*, em placas de cultura de fundo chato de 24 poços, em uma atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o conteúdo de cada poço foi coletado, transferido para um eppendorf identificado e centrifugado a 14000 rpm a temperatura ambiente por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e armazenado a -80°C até sua utilização.

A detecção e quantificação de citocinas presentes no plasma dos cães e no sobrenadante das culturas foram realizadas utilizando-se kits comerciais anti-citocinas caninas (R&D Systems, EUA). Os ensaios foram realizados segundo protocolo sugerido pelo fabricante.

#### **7.9.4 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico *ex vivo* por citometria de fluxo**

O ensaio de fenotipagem celular foi realizado seguindo protocolo segundo Fujiwara et al. 2006. Para a avaliação *ex vivo* foram utilizadas as células mononucleares obtidas de acordo com o item 7.9.1.

Resumidamente, as PBMCs foram incubadas com solução de lise (BD FACS Lysing Solution, BD Biosciences, EUA) por 10 minutos a temperatura ambiente para lise dos eritrócitos e fixação das células. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície celular para avaliação de subpopulações de células T (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), células B (CD21<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>). As células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, EUA) selecionando-se a fluorescência das populações de linfócitos ou monócitos. Vinte mil eventos foram adquiridos e controles isotípicos utilizados em todos os experimentos.

#### **7.9.5 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto solúvel de *A. vasorum* e *A. caninum***

A resposta humoral foi avaliada utilizando-se plasma dos cães. Os pontos escolhidos para esta análise foram os mesmo utilizados na avaliação das citocinas, como demonstrado no item 7.9.3. O ensaio de ELISA indireta foi utilizado para a pesquisa dos anticorpos IgG e IgE

específicos para os antígenos solúveis de *A. vasorum* e *A. caninum*. A concentração ideal do plasma e dos anticorpos específicos utilizados foram previamente testados e padronizados utilizando plasma de animais positivos e negativos para a infecção por *A. vasorum* e *A. caninum*.

Após a padronização do ELISA, placas de 96 poços (Maxisorp, Nunc, EUA) foram sensibilizadas com 5 µg/mL de antígeno bruto de *A. caninum* e *A. vasorum* diluídos em tampão de lavagem e incubadas over night a -4°C. Após realizado o bloqueio da placa, foi adicionado o plasma dos animais na concentração de 1:100 e a placa foi incubada novamente a -4°C over night. . Anticorpos policlonais marcados com enzima peroxidase específicos para IgG e IgE de cão (Bethyl Laboratories, EUA) foram adicionados nas diluições de 1:5000 para IgG e 1:500 para IgE. A reação foi revelada pelo uso de peróxido de hidrogênio (Sigma, EUA) e OPD (O-phenylenediamine, Sigma, EUA). A densidade óptica para cada amostra foi determinada a 492 nm no leitor de placas de ELISA (Versamax, Molecular Devices, EUA).

### **7.10 Análise estatística**

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc, EUA). Para verificar a normalidade dos dados, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise entre dois grupos foram utilizados o Test T Student para dados paramétricos e Mann-Whitney U para dados não paramétricos. Além disso, foram utilizados para determinar diferença significativa entre as médias ou medianas de pelo menos três grupos analisados, os testes ANOVA seguido do de Bonferroni (dados paramétricos) e os testes de Kruskal Wallis seguido do de Dunns (dados não-paramétricos). O teste de Grubb foi utilizado para detectar a presença de possíveis *outliers* nas amostras. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentarem um valor de  $P \leq 0,05$ .

## 8. RESULTADOS

Os resultados apresentados são do acompanhamento parasitológico, hematológico e imunológico realizado na segunda fase do experimento (120 dias).

### 8.1 Acompanhamento parasitológico

Todas as infecções realizadas foram bem sucedidas e o período pré-patente (PPP) das infecções foi determinado pelo encontro de ovos (infecção por *A. caninum*) e larvas (infecção por *A. vasorum*) nas fezes dos cães. A variação entre os PPP de cada grupo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Período pré-patente da infecção (dias após a infecção) por *Ancylostoma caninum* e *Angiostrongylus vasorum* encontrados no grupo C – cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com 100 L3 kg/pv de *A. caninum* e no grupo D – cães infectados simultaneamente com 100 L3 kg/pv de *A. vasorum* e 100 L3 kg/pv de *A. caninum*.

| Animal     | Grupo B               |                       | Grupo C               |                       | Grupo D               |  |
|------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
|            | PPP <i>A. vasorum</i> | PPP <i>A. caninum</i> | PPP <i>A. vasorum</i> | PPP <i>A. caninum</i> | PPP <i>A. vasorum</i> |  |
| 1          | 67                    | 22                    | 67                    | 16                    | 76                    |  |
| 2          | 62                    | 19                    | 72                    | 19                    | 49                    |  |
| 3          | 59                    | 16                    | 65                    | 16                    | 37                    |  |
| 4          | 65                    | 16                    | 62                    | 25                    | 82                    |  |
| 5          | 52                    | 19                    | 65                    | 13                    | 70                    |  |
| Média ± DP | 61,0 ± 5,8            | 18,4 ± 2,5            | 66,2 ± 3,7            | 17,8 ± 4,5            | 62,8 ± 19,0           |  |

PPP= período pré-patente

DP= Desvio Padrão

Durante todo o período de acompanhamento experimental os cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) eliminaram larvas, e os cães coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D) eliminaram larvas e ovos nas fezes, não havendo negativação dos exames parasitológicos. Os números de L1 de *A. vasorum* e ovos de *A. caninum* eliminados junto com as fezes, variaram entre as coletas, com picos e declínios ao longo do experimento.

Os valores médios de LPG e OPG encontrados nos Grupos B, C e D durante o período experimental dos cães estão representados na Figura 1.

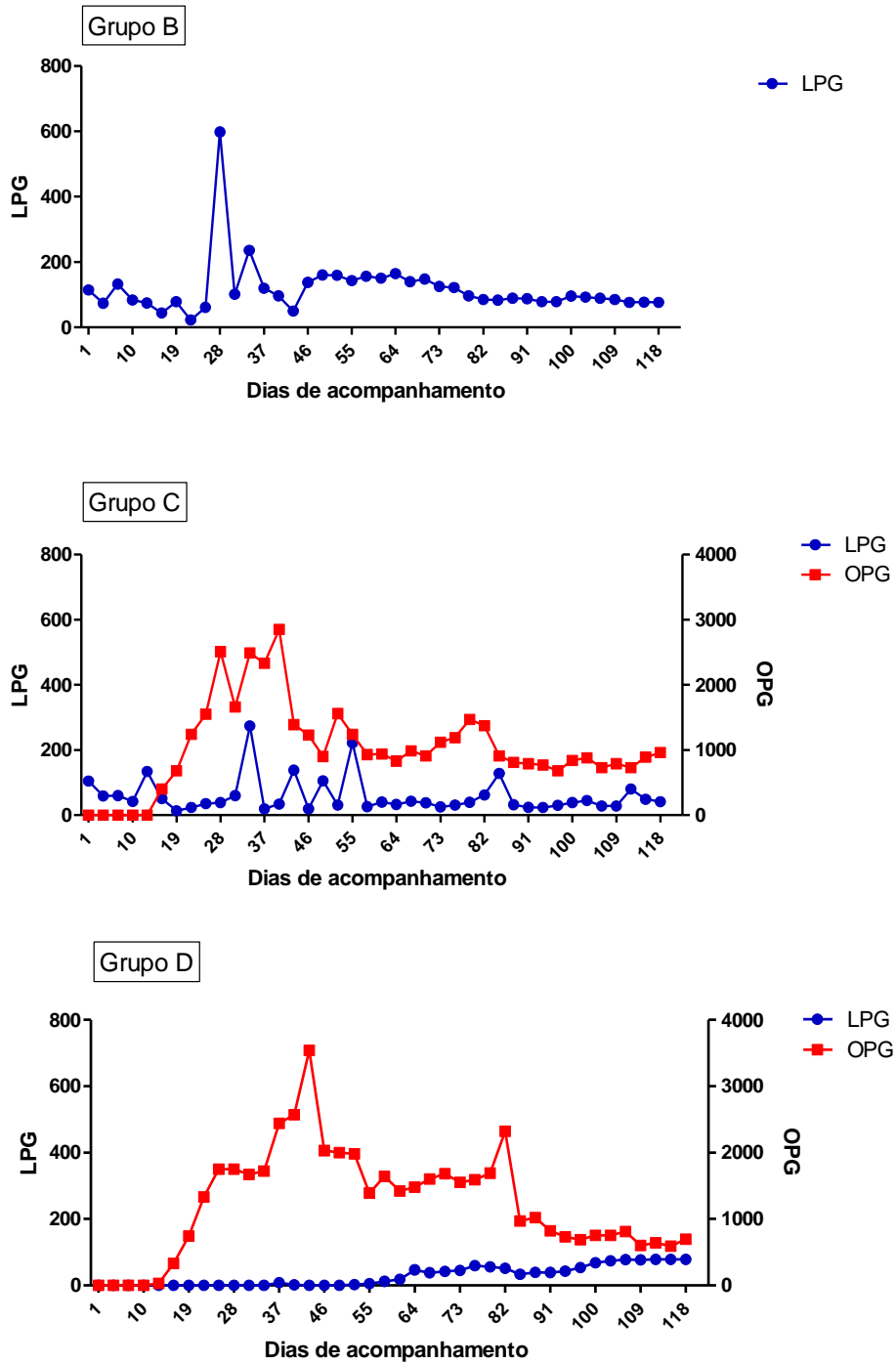


Figura 1: Cinética da eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* e de ovos de *Ancylostoma caninum* por grama de fezes (LPG, OPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

Durante a análise dos resultados, foi observado que a média total de LPG ao final do experimento do grupo de cães com angiostrongilose crônica, Grupo B, foi significativamente superior a média do grupo de cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum*, Grupo C, ( $p < 0.0001$ ), como demonstrado no Gráfico 1.

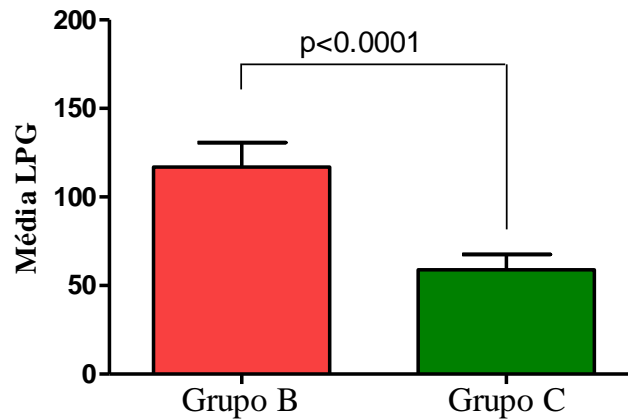


Gráfico 1: Média total da eliminação de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* por grama de fezes (LPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C).

Em relação à média total das contagens de OPG, não foi observada diferença significativa entre o grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum*, Grupo C, e o grupos de cães infectados simultaneamente com os dois parasitos, Grupo D, ( $p = 0.2238$ ), como demonstrado no Gráfico 2.

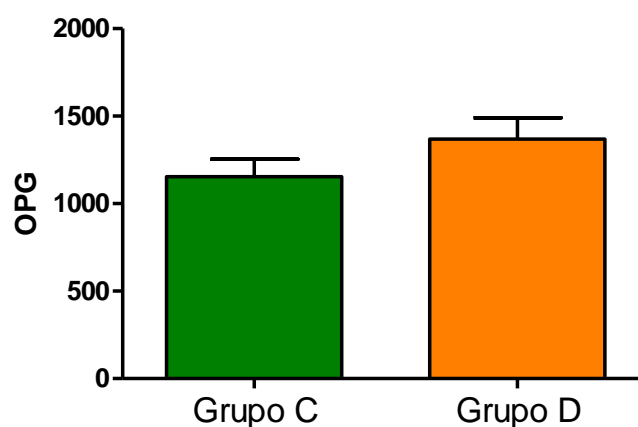


Gráfico 2: Média total da eliminação de ovos por grama de fezes (OPG) em grupos de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

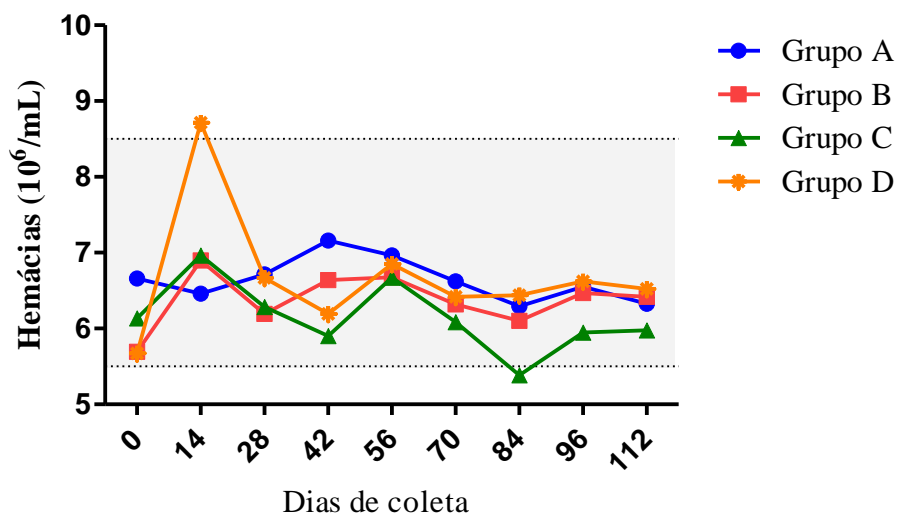


## 8.2 Avaliação hematológica

### 8.2.1 Hemograma

#### 8.2.1.1 Hemácias

No Gráfico 3 encontram-se os valores médios das contagens de hemácias nos grupos. A partir da terceira coleta de sangue, no 28º dia de acompanhamento dos grupos, foi observado que o número de hemácias nos grupos de cães infectados (Grupos B, C e D) ficou abaixo do valor encontrado para o grupo de cães não infectados (Grupo A), porém sem diferença estatística ( $p > 0.05$ ). O Grupo C, cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum*, e o Grupo D, cães infectados simultaneamente com os dois parasitos, apresentaram um leve aumento no número de hemácias na última coleta, também sem diferença significativa entre os valores. Apenas o Grupo D apresentou valores significativamente superiores aos demais grupos no 14º dia de acompanhamento ( $p < 0.05$ ).

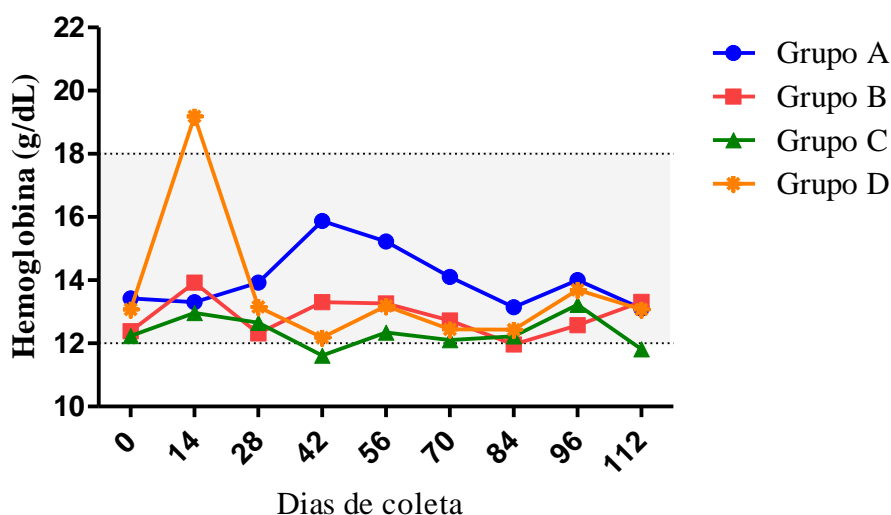


\* Valores de referência: 5,50 – 8,50 x 10<sup>6</sup>/mL

Gráfico 3: Valores médios de hemácias em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.1.2 Hemoglobina

Os valores médios de hemoglobina do Grupo C, cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum*, foram estatisticamente inferiores aos valores do grupo A, cães sem infecção, entre o 42º e o 70º dia de acompanhamento, como demonstrado no Gráfico 4, ( $p=0.0014$ ). No 14º dia de acompanhamento o valor da concentração de hemoglobina encontrado no Grupo D, cães infectados simultaneamente com os dois parasitos, foi significativamente superior aos valores observados nos demais grupos do experimento ( $p<0.05$ ).

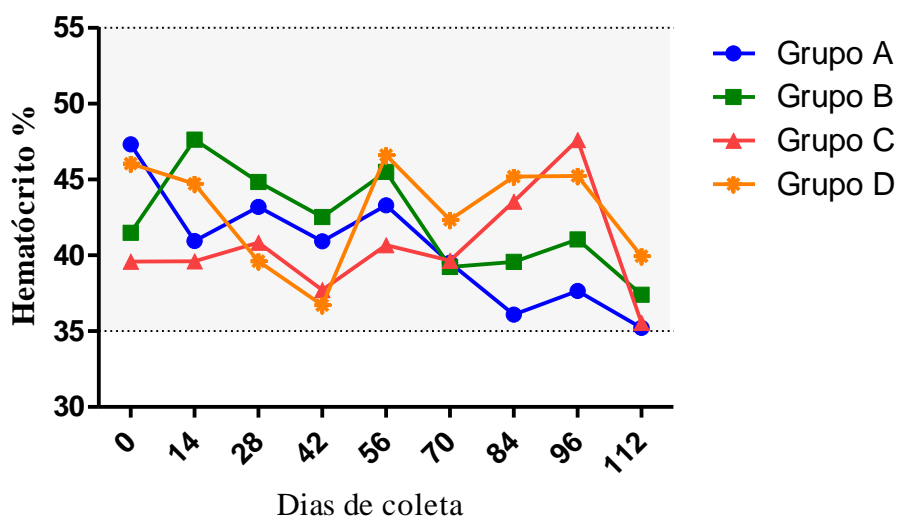


\* Valores de referência: 12,00 – 18,00 g/dL

Gráfico 4: Valores médios da concentração de hemoglobina em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.1.3 Hematócrito

No Gráfico 5 estão representados os valores médios do hematócrito dos grupos experimentais. Os valores médios do Grupo B, cães com angiostrongilose crônica, foram superiores aos valores médios do grupo de cães não infectados, Grupo A, ao longo do experimento, sem diferença estatística. Os valores médios dos grupos de cães coinfectados, Grupo C e D, se mantiveram abaixo dos valores do Grupo A até o 56º dia de acompanhamento, sendo que a partir deste ponto, observou-se um aumento dos valores nesses grupos até o 96º dia de acompanhamento, também sem diferença estatística ( $p > 0.05$ ).

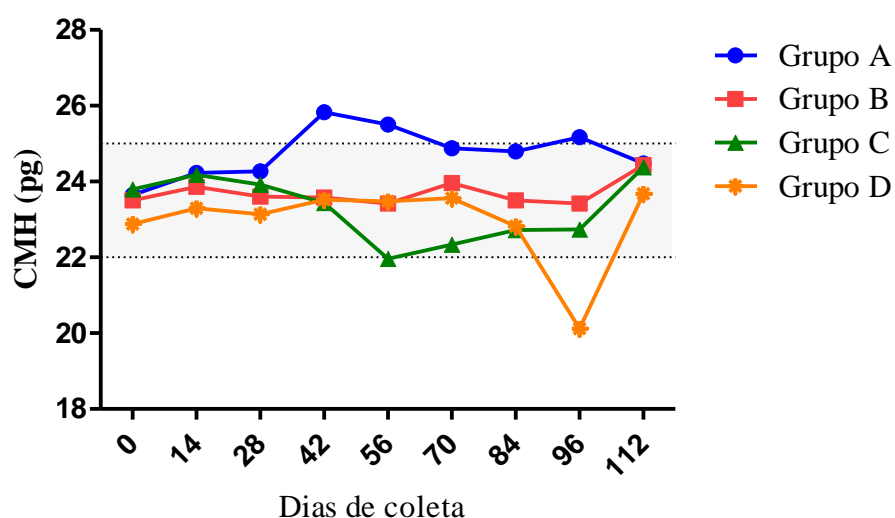


\* Valores de referência: 35 – 55%

Gráfico 5: Valores médios do hematócrito em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.1.4 Concentração média de hemoglobina (CMH)

Os valores da concentração média de hemoglobina (CMH) dos grupos de cães coinfectados (Grupos C e D) apresentaram-se significativamente inferiores aos valores do grupo de cães não infectados (Grupo A) entre o 42º e 96º dia de acompanhamento ( $p=0.0004$ ) valores demonstrados no Gráfico 6. A curva com os valores médios de cada grupo permaneceu sem grandes oscilações ao longo do experimento.

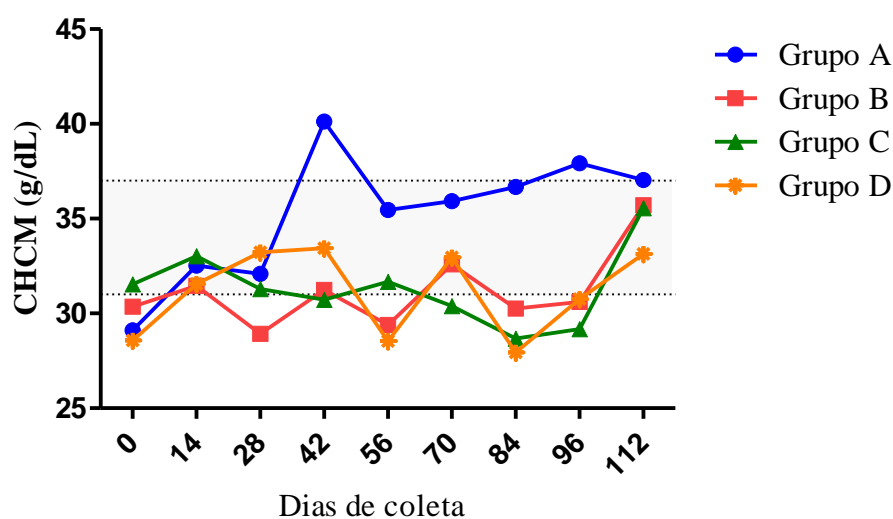


\* Valores de referência: 22 – 25 pg

Gráfico 6: Valores da concentração média de hemoglobina (CMH) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.1.5 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

Os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média por grupo estão representados no Gráfico 7. Os grupos de cães infectados (Grupos B, C e D) apresentaram valores estatisticamente inferiores aos do grupo de cães não infectados (Grupo A) a partir do 42º dia de acompanhamento ( $p=0.0028$ ). Houve uma queda nos valores dos grupos infectados a partir desse período com uma pequena elevação no 112º dia de acompanhamento.

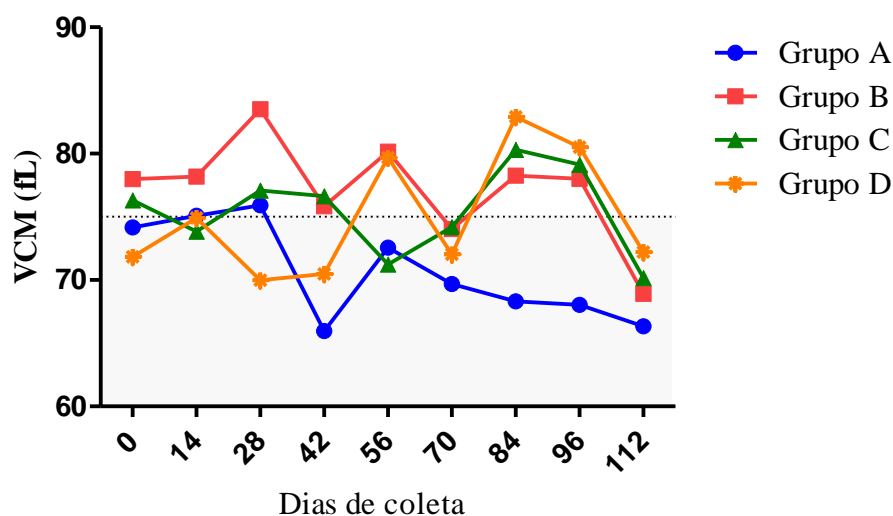


\* Valores de referência: 31- 37 g/dL

Gráfico 7: Valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.1.6 Volume corpuscular médio (VCM)

Como demonstrado no Gráfico 8, os valores do volume corpuscular médio (VCM) de todos os grupos apresentou variações, picos e declínios, ao longo do experimento. Embora não tenha sido observada diferença estatística dos valores entre os grupos ( $p=0.1142$ ), os cães infectados apresentaram macrocitose em alguns dias do experimento.



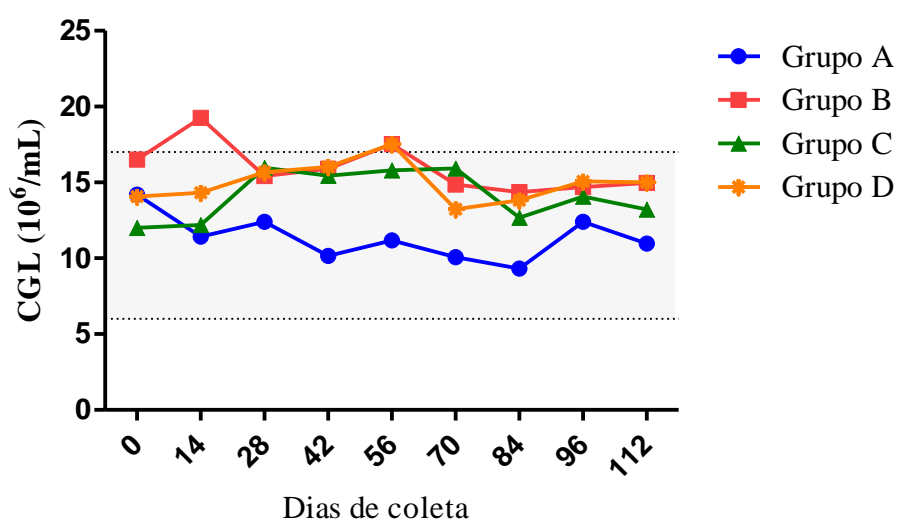
\* Valores de referência: 60 – 75 fL

Gráfico 8: Valores do volume corpuscular médio (VCM) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

## 8.2.2 Leucograma

### 8.2.2.1. Contagem global de leucócitos

Os valores médios da contagem global de leucócitos dos grupos estão no Gráfico 9. Os valores do grupo de cães infectados (Grupo B, C e D) permaneceram acima dos valores encontrados para o grupo de cães não infectados (Grupo A). Entretanto houve diferença estatística somente entre os valores do Grupo A com os valores dos Grupos B e D ( $p=0.003$ ).

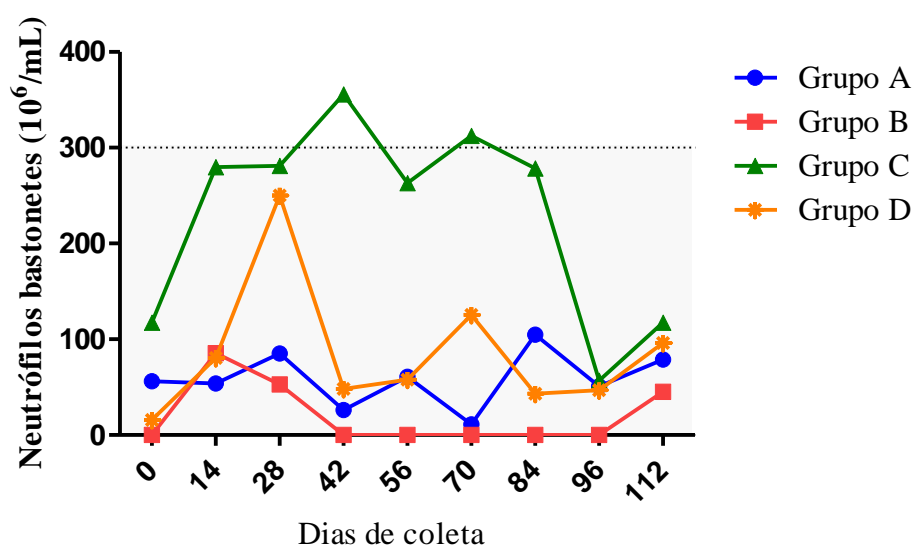


\* Valores de referência: 6 – 17 x  $10^6/\text{mL}$

Gráfico 9: Média da contagem global de leucócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D)..

### 8.2.2.2 Neutrófilos bastonetes

No Gráfico 10 estão representados os valores médios de neutrófilos bastonetes para cada grupo do experimento. Os grupos de cães coinfectados por *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D) apresentaram uma maior taxa de neutrófilos bastonetes durante o experimento que os demais grupos, entretanto uma diferença significativa entre esses valores foi observada apenas em relação ao grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) ( $p=0.0001$ ). O grupo B apresentou valores semelhantes aos valores encontrados no grupo de cães não infectados (Grupo A).



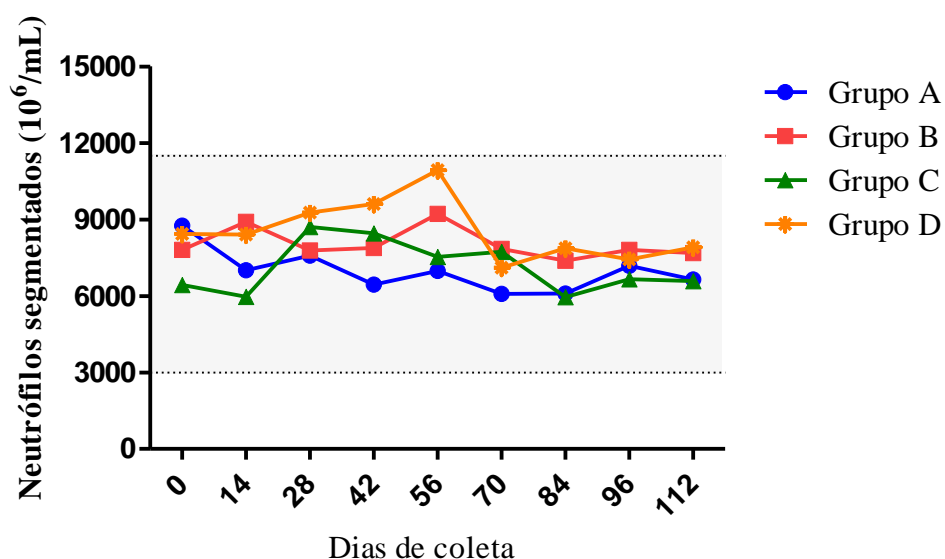
\* Valores de referência: 0 – 300 x  $10^6/mL$

Gráfico 10: Média da contagem global de neutrófilos bastonetes em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).



### 8.2.2.3 Neutr3filos segmentados

Os valores m3dios da contagem global de neutr3filos segmentados est3o representados no Gr3fico 11. Os valores dos c3es sem infec33o (Grupo A) se mantiveram constantes ao longo do per3odo experimental. O grupo de c3es com angiostrongilose cr3nica (Grupo B) mantiveram valores constantes, com um leve aumento ao 56º dia de acompanhamento. O grupo de c3es com angiostrongilose cr3nica infectados com *A. caninum* e o grupo de c3es infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupos C e D) apresentaram um aumento nos valores m3dios ate os dias 28º e 56º dias de acompanhamento, respectivamente, seguido de queda e estabiliza33o. N3o houve diferen3a estat3stica entre os valores m3dios dos grupos ( $p>0.05$ ).

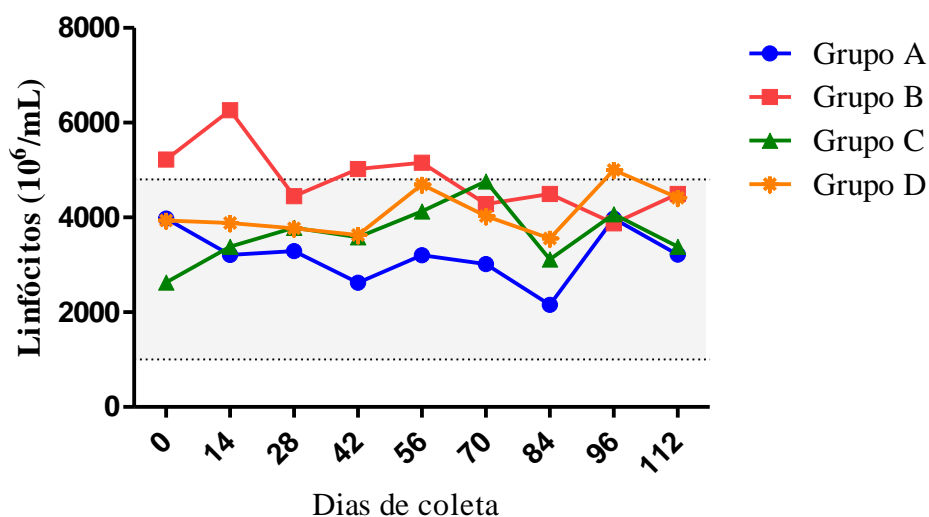


\* Valores de refer3ncia: 3.000 – 11.500 x 10<sup>6</sup>/mL

Gr3fico 11: M3dia da contagem global de neutr3filos segmentados em c3es n3o infectados (Grupo A), c3es com angiostrongilose cr3nica (Grupo B), c3es com angiostrongilose cr3nica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e c3es infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.2.4 Linfócitos

Todos os grupos apresentaram oscilações nos valores médios de linfócitos durante o período experimental como demonstrado no Gráfico 12. O grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e o grupo de cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupo D) apresentou valores significativamente superiores aos valores observados no grupo de cães não infectados (Grupo A) do 14º ao 96º dia de acompanhamento ( $p < 0.001$ ). O grupo de cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) também apresentou valores inferiores em relação ao grupo B ( $p < 0.001$ ) até o 56º dia de acompanhamento.

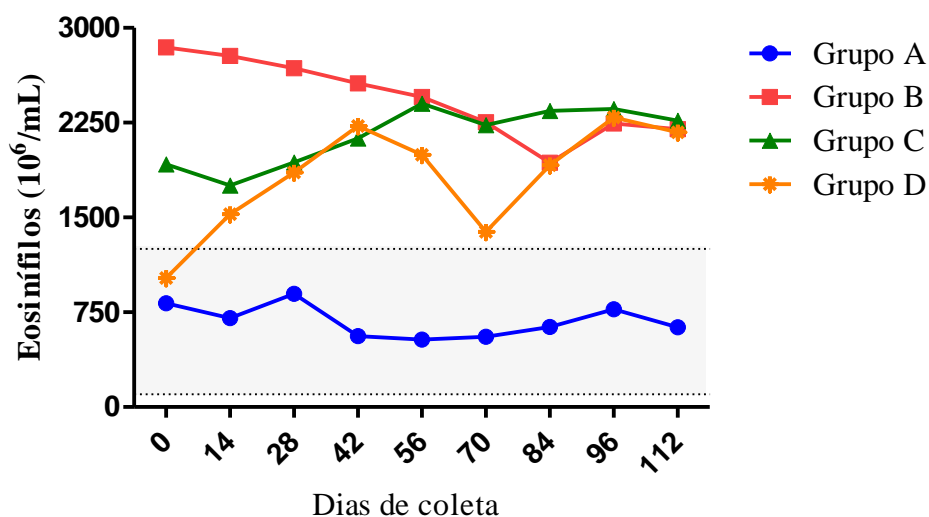


\* Valores de referência:  $1.000 - 4.800 \times 10^6/mL$

Gráfico 12: Média da contagem global de linfócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.2.5 Eosinófilos

Os grupos de cães infectados (Grupos B, C e D) apresentaram eosinofilia durante todo o período experimental, com valores estatisticamente superiores aos do grupo de cães não infectados (Grupo A) ( $p < 0.0001$ ), como demonstrado no Gráfico 13.

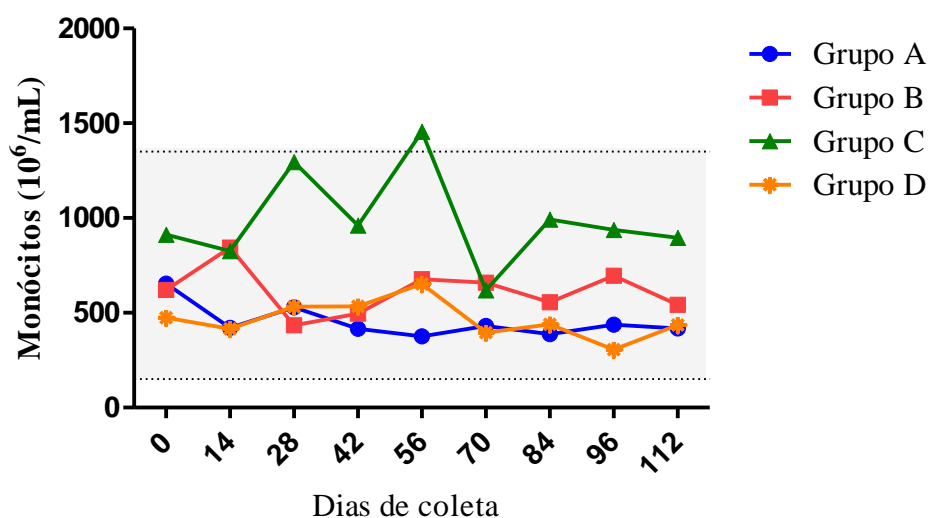


\* Valores de referência:  $100 - 1.250 \times 10^6/\text{mL}$

Gráfico 13: Média da contagem global de eosinófilos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.2.6 Monócitos

Como demonstrado no Gráfico 14, os valores do Grupo C, cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum*, mantiveram-se elevados em relação aos demais grupos em quase todo o período experimental, com exceção do 70º dia de acompanhamento ( $p < 0.0001$ ). Não houve diferença significativa entre os valores dos demais grupos.

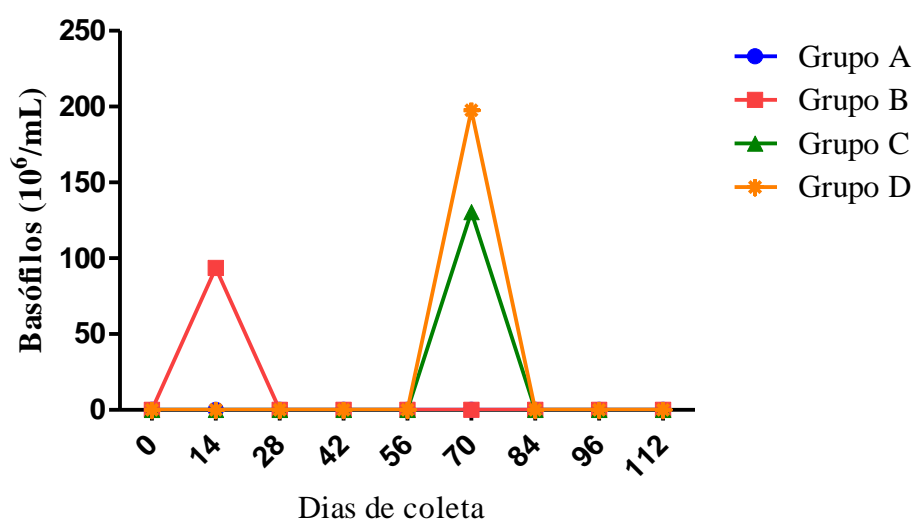


\* Valores de referência:  $150 - 1.350 \times 10^6/\text{mL}$

Gráfico 14: Média da contagem global de monócitos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.2.7 Basófilos

Não foi observado nenhum basófilo no Grupo A, cães não infectados, ao longo do experimento, como demonstrado no Gráfico 15. No Grupo B, cães com angiostrongilose crônica, apenas no 14º dia de acompanhamento essa tipo celular foi observado. E nos grupos C, cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum*, e D, cães infectados simultaneamente com os dois parasitos, no 70º dia de acompanhamento. Houve diferença estatística nos valores do grupo D em relação aos grupos A e B no 70º dia de acompanhamento.



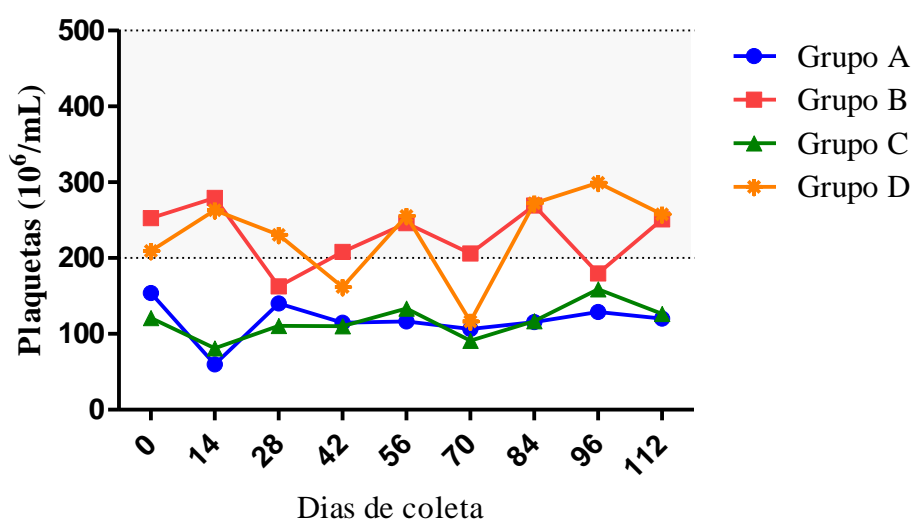
\* Valores de referência: raro

Gráfico 15: Média da contagem global de basófilos em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.2.3 Avaliação das plaquetas

Os animais do grupo de cães não infectados e de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupos A e C) apresentaram trombocitopenia discreta conforme indica os baixos valores para a contagem plaquetária e o baixo percentual de volume do sangue ocupado pelas plaquetas. Entretanto, o grupo A são animais controle, sem infecção. E o grupo C já apresentava trombocitopenia no dia 0.

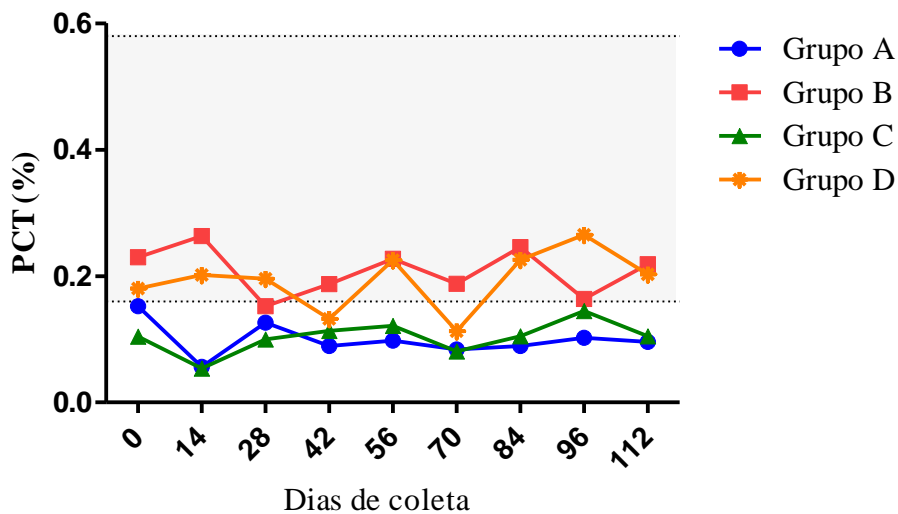
O Gráfico 16 mostra os valores das contagens de plaquetas nos grupos ao longo do experimento. Houve diferença estatística significativa entre os valores do grupo A e C em relação aos grupos B e D ( $p < 0.0001$ ). Os grupos A e C apresentaram valores inferiores aos grupos B e D no 14º DPI ( $p < 0.01$ ). Os valores do grupo A também foram estatisticamente inferiores aos do grupo D no 96º DPI ( $p < 0.05$ ).



\* Valores de referência: 200 – 500 x  $10^6/\text{mL}$

Gráfico 16: Valores de plaquetas (PLT) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

O percentual de volume do sangue ocupado pelas plaquetas nos grupos A e C foi estatisticamente inferior aos dos grupos B e D ( $p < 0.0001$ ). Os grupos A e C apresentaram valores abaixo da faixa de referência da espécie durante todo o período experimental. Nos 14° e 84° o grupo A apresentou valores estatisticamente inferiores ao do grupo B ( $p < 0.05$ ) e no 96° DPI em relação ao grupo D ( $p < 0.05$ ). Também houve diferença estatística nos valores entre B e C no 14° DPI ( $p < 0.01$ ). Dados demonstrados no Gráfico 17.



\* Valores de referência: 0.16 – 0,58 %

Gráfico 17: Valores de plaquetócrito (PCT) em cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D).

### 8.3 Peso dos cães

Foram realizadas nove pesagens dos cães ao longo do experimento (nos mesmos dias em que foram realizadas as coletas de sangue). As médias do peso dos cães de cada grupo durante o período experimental estão representadas no Gráfico 18.

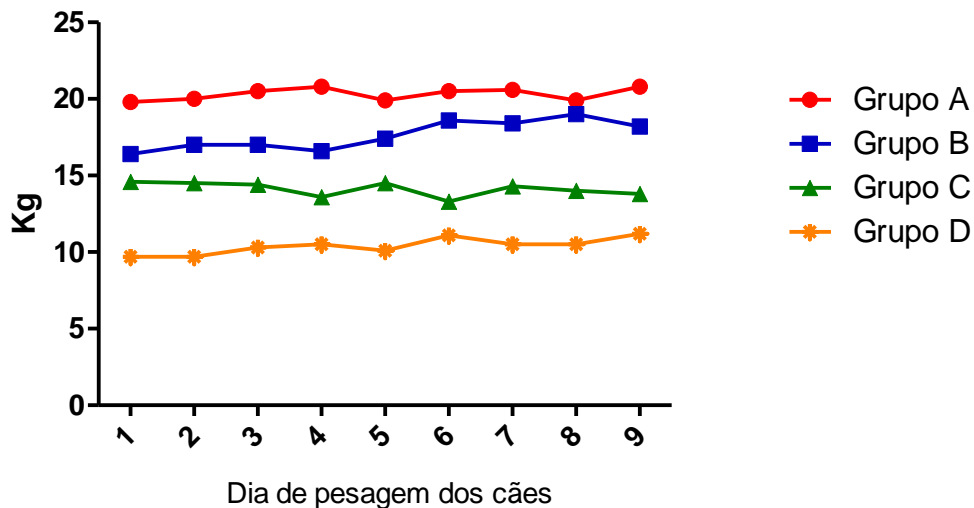


Gráfico 18: Média do peso dos cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ao longo do experimento.

O grupo de cães não infectados (Grupo A) apresentou um aumento no peso médio final. Fato também observado nos grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D). Apenas o grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C), apresentou uma redução do peso médio final. A variação do peso (Peso final – Peso inicial) dos cães infectados não apresentou diferença significativa em relação à variação do peso dos cães não infectados ( $p=0.1143$ ) como representado no Gráfico 19.



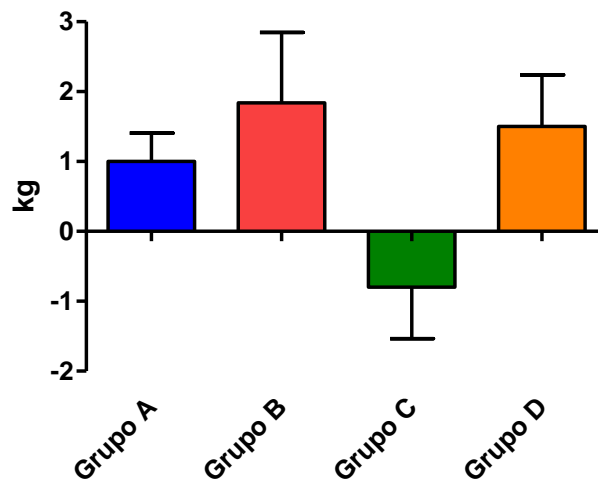
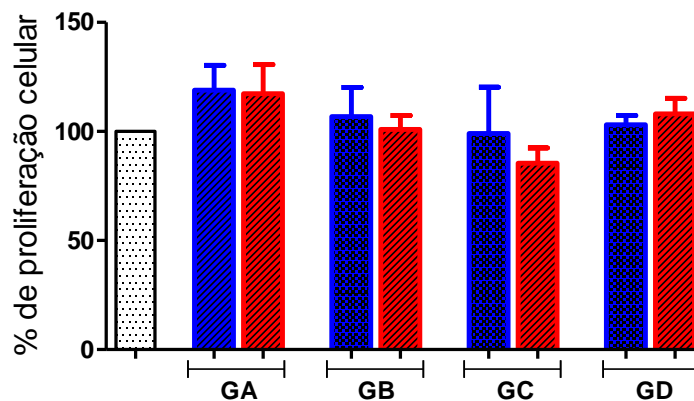


Gráfico 19: Variação de peso dos cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D) ao final do 120 dias de acompanhamento.

## 8.4 Ensaio de proliferação celular

A capacidade proliferativa, *in vitro*, de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães não infectados, infectados com *A. vasorum* e coinfectedados com *A. vasorum* e *A. caninum* frente a estímulo antigênico dos parasitos adultos foi analisada pelo ensaio colorimétrico de MTT.

A análise dos dados mostrou que não houve diferença significativa na proliferação entre células de cães não infectados (Grupo A) e células de cães infectados (Grupos B, C e D) estimuladas com antígeno bruto de *A. vasorum* ( $p=0.2197$ ) quando comparadas as células não estimuladas (cultura controle). Também não houve diferença estatística na proliferação celular entre os grupos infectados (B, C e D) ( $p>0.05$ ). Em relação a proliferação das células estimuladas com antígeno bruto de *A. caninum*, não foi observada diferença estatística entre o grupo não infectado e os grupos infectados ( $p=0.6579$ ), ou diferença nos valores de proliferação entre os grupos infectados ( $p>0.05$ ). Gráfico 20.



- █ Cultura controle - não estimula com antígenos
- █ Cultura de células estimuladas com antígeno bruto solúvel de *Ancylostoma caninum*
- █ Cultura de células estimuladas com antígeno bruto solúvel de *Angiostrongylus vasorum*

Gráfico 20. Média da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) e cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupo D), estimuladas com antígeno bruto solúvel de vermes adultos de *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum*.

## 8.5 Determinação da produção de citocinas no plasma de cães e em sobrenadantes de culturas

A Figura 2 mostra a dosagem das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23p40, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por ELISA de captura no plasma de cães sem infecção (Grupo A), infectados com *A. vasorum* ou coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos B, C e D).

Em relação à citocina TNF- $\alpha$ , não foi observada diferença estatística entre os grupos de animais infectados (Grupos B, C e D) nos tempos avaliados (Figura 2A) e essa citocina não foi detectada no grupo de cães sem infecção (Grupo A). A avaliação dos dados demonstra uma concentração estatisticamente menor da citocina IL-12/IL-23p40 nos grupos de cães coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (C e D) quando comparado ao grupo de cães infectados apenas com *A. vasorum* (B) ( $p=0.0027$ ) (Figura 2B). Em relação à citocina IFN- $\gamma$ , pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos ( $p=0.7385$ ) e que esta citocina não foi detectada no grupo A e no grupo D (GD 1 – plasma coletado antes da infecção dos cães, no dia zero) (Figura 2C). Quando avaliamos a citocina IL-4, observamos que o grupo A apresenta uma maior secreção em relação aos demais grupos, porém sem diferença estatística ( $p=0.3280$ ) (Figura 2D). Na avaliação da citocina IL-10 os grupos C e D apresentaram um aumento na concentração dessa citocina quando comparado ao grupo B ( $p=0.0055$ ) (Figura 2E).

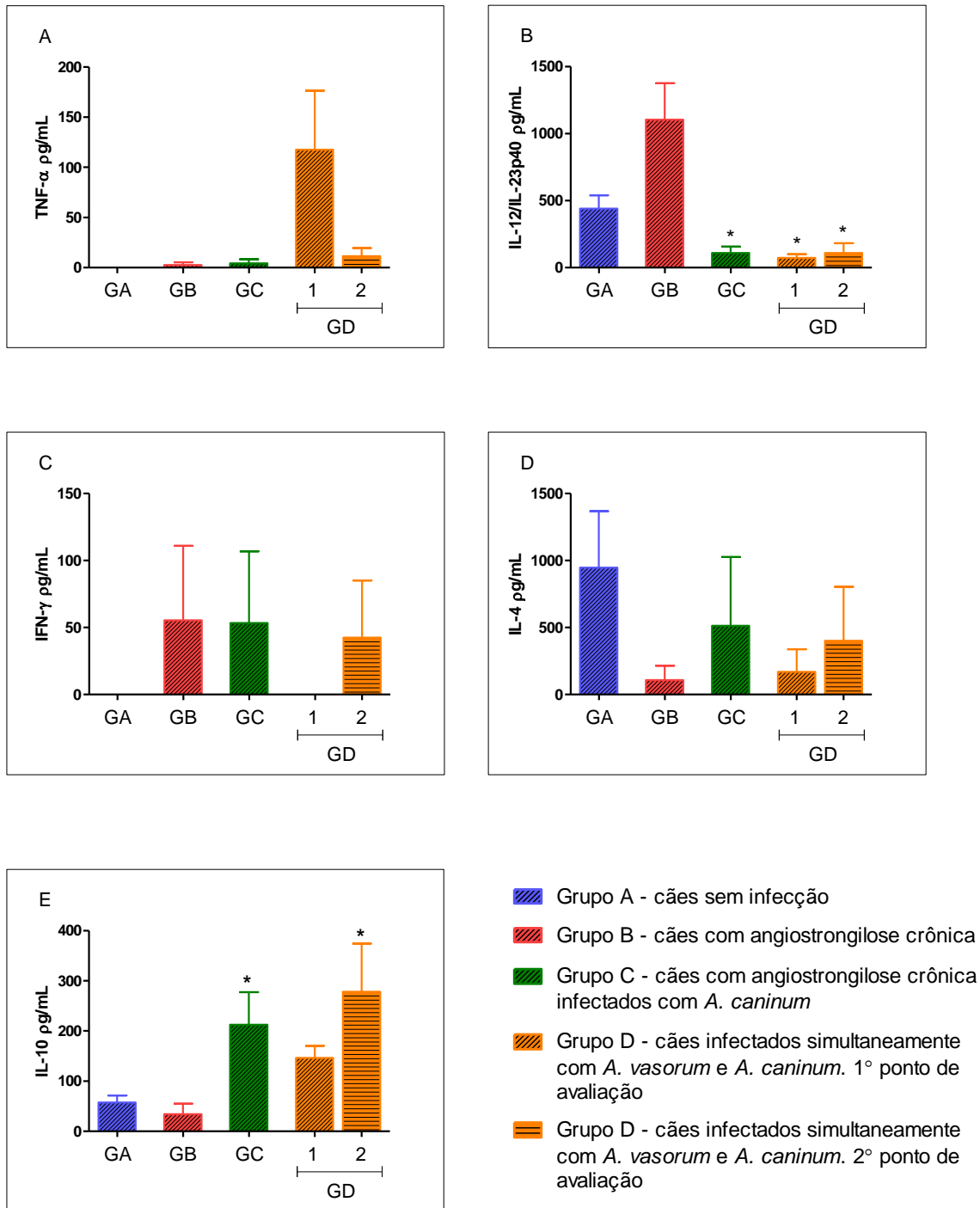


Figura 2: Valores médios da concentração de citocinas no plasma de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfetados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D). As letras representam os gráficos: A (TNF- $\alpha$   $\mu\text{g/mL}$ ), B (IL-12/IL-23p40  $\mu\text{g/mL}$ ), C (IFN- $\gamma$   $\mu\text{g/mL}$ ), D (IL-4  $\mu\text{g/mL}$ ) e E (IL-10  $\mu\text{g/mL}$ ). As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as médias do grupo B.

Para verificar se as citocinas circulantes encontradas no plasma dos cães são resultado de uma resposta específica do hospedeiro contra os parasitos, células mononucleares (PBMCs) foram isoladas do sangue periférico dos cães e estimuladas *in vitro* por 72 horas com antígeno bruto solúvel de ambos os parasitos.

A figura 3 mostra os resultados de avaliação do delta (diferença entre a produção na cultura estimulada e a cultura não estimulada) da produção de citocinas nas culturas. Observa-se um aumento de produção da citocina TNF- $\alpha$  em culturas de células, estimuladas com antígeno de *A. vasorum* e de *A. caninum*, dos cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (D) quando comparado com as culturas do grupo de cães sem infecção (A) e dos cães com angiostrongilose crônica (B), porém não houve diferença estatística entre os grupos ( $p=0.5243$ ) (Figura 3A). Os dados da produção de IL-12/IL-23p40 mostram que o grupo A possuem maior delta na cultura estimulada com antígeno de *A. caninum* quando comparado com os demais grupos, mas novamente sem diferença estatística entre eles ( $p>0.05$ ) (Figura 3B). Quanto a análise de IFN- $\gamma$ , pode-se observar uma maior produção dessa citocina nas culturas, estimuladas com antígeno de *A. caninum*, nos grupos A e C, mas sem diferença estatística entre eles ou entre os demais grupos ( $p=0.1469$  e  $p>0.05$ , respectivamente). Nas culturas estimuladas com antígeno de *A. vasorum*, não foi detectada a presença de IFN- $\gamma$  (Figura 3C). A análise dos dados da produção de IL-4 não mostrou diferença estatística entre os grupos ( $p=0.6796$ ), entretanto em todos os grupos, essa citocina foi detectada em cultura estimulada com antígenos de *A. vasorum* ou de *A. caninum* (Figura 3D). Os dados de IL-10 mostram uma maior produção nos grupos A, C e D quando comparado ao grupo B. Entretanto somente foi observada diferença estatística significativa entre o grupo B e C nas culturas estimuladas com antígeno de *A. vasorum* e *A. caninum* ( $p=0.0223$  e  $p=0.0201$ ) (Figura 3E).

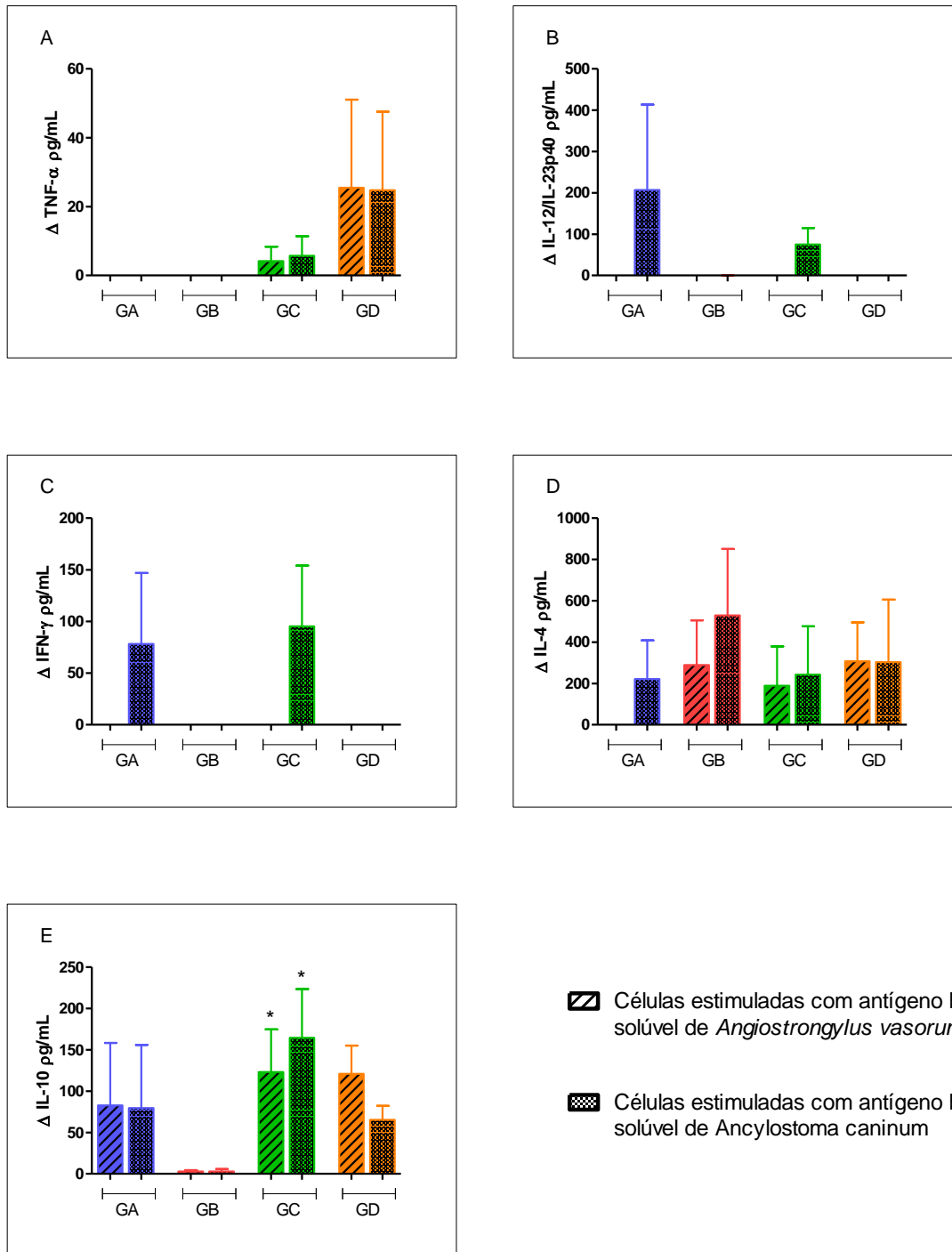


Figura 3: Valores médios da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de cães não infectados (GA), cães com angiostrongilose crônica (GB) e cães coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (GC e GD) estimuladas com antígenos de *A. vasorum* e *A. caninum*. As letras representam os gráficos: A ( $\Delta$  TNF- $\alpha$  pg/mL), B ( $\Delta$  IL-12/IL-23p40 pg/mL), C ( $\Delta$  IFN- $\gamma$  pg/mL), D ( $\Delta$  IL-4 pg/mL) e E ( $\Delta$  IL-10 pg/mL). As diferenças estatísticas significativas ( $p < 0.05$ ) estão representadas pelo \* em comparação com as médias encontradas no grupo B.

## 8.6 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico *ex vivo* por citometria de fluxo

A figura 4 mostra os resultados do percentual das subpopulações de linfócitos T ( $CD3^+CD4^+$  e  $CD3^+CD8^+$ ), B ( $CD21^+$ ) e monócitos ( $CD14^+$ ) no sangue periférico de cães não infectados (Grupo A) e cães infectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos B, C e D) no 80º dia de acompanhamento dos cães.

A análise dos resultados mostrou que os cães do grupo C apresentaram uma menor porcentagem de células T ( $CD3^+CD4^+$ ) circulantes quando comparado aos cães do grupo A ( $p=0.0378$ ). Entretanto não houve diferença significativa na porcentagem das subpopulações de células T ( $CD3^+CD8^+$ ) ( $p=0.2178$ ), células B ( $CD21^+$ ) ( $p=0.7568$ ) e monócitos ( $CD14^+$ ) circulantes entre os demais grupos ( $p=0.5028$ ).

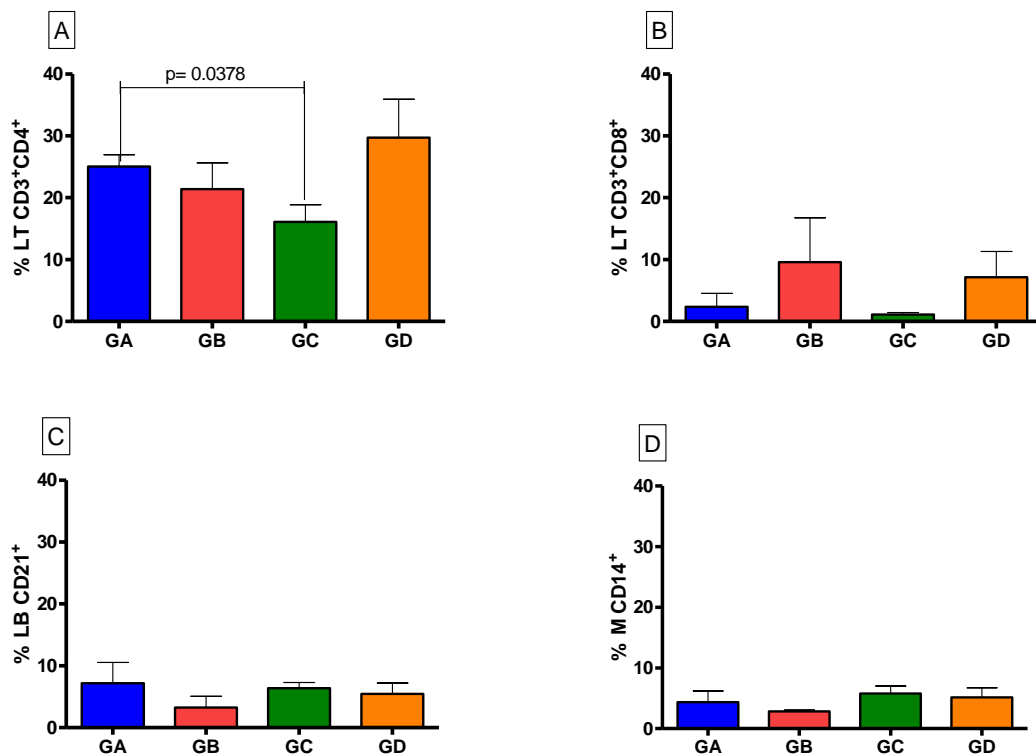


Figura 4: Porcentagem média de células circulantes no sangue periférico *ex vivo* de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfectedados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D), analisadas por citometria de fluxo. As letras representam os gráficos: A (% LT  $CD3^+CD4^+$ ), B (% LT  $CD3^+CD8^+$ ), C (% LB  $CD21^+$ ) e D (% M  $CD14^+$ ).

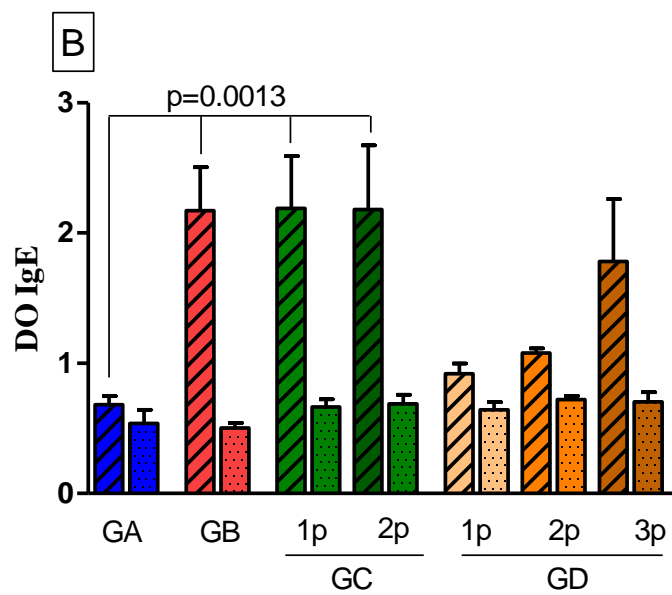
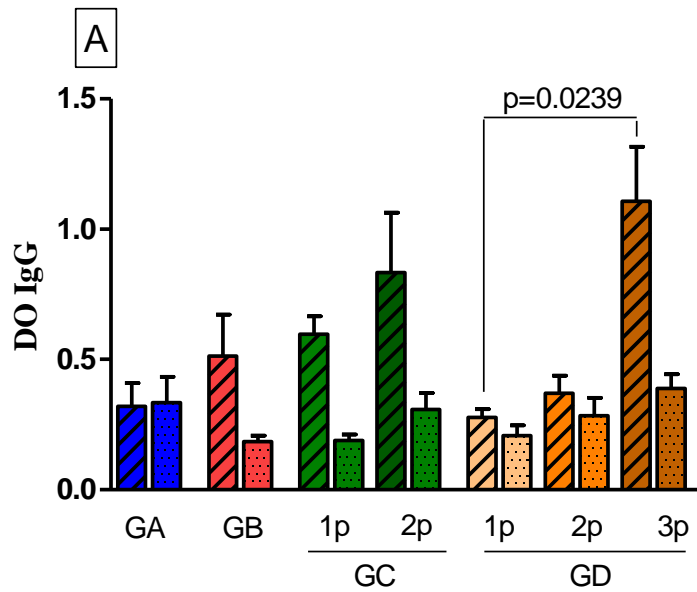
### **8.7 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto solúvel de *A. vasorum* e *A. caninum***

A figura 5 mostra a reatividade de anticorpos IgG e IgE anti-antígeno bruto de *A. vasorum* e *A. caninum*, em densidade óptica (DO) ao plasma dos cães não infectados (Grupo A) e dos cães infectados (Grupos B, C e D).

A avaliação de IgG antígeno-específico de *A. vasorum*, mostrou que em animais do grupo D ocorre uma produção significativamente maior nos níveis do anticorpos circulante após o início da eliminação de L1 de *A. vasorum* pelos cães ( $p=0.0239$ ). Entretanto não foi encontrado diferença nos níveis de IgG reagentes a antígenos de *A. caninum* entre nenhum dos grupos avaliados ( $p=0.1825$ ) (Figura 5A).

Ao avaliar os resultados de IgE antígeno-específico de *A. vasorum* circulantes no plasma dos cães infectados dos grupo B e C, percebemos uma maior produção quando comparado ao grupo de cães não infectados (Grupo A) ( $p=0.0013$ ). Não foi encontrada diferença estatística nos valores de IgE antígeno-específico de *A. caninum* entre nenhum dos grupos ( $p=0.1363$ ) (Figura 5B).





▨ Anticorpos anti-antígeno bruto de *A. vasorum*

▤ Anticorpos anti-antígeno bruto de *A. caninum*

Figura 5: Reatividade de anticorpos anti-antígenos brutos de *Angiostrongylus vasorum* e de *Ancylostoma caninum* em plasma de cães não infectados (Grupo A), cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e cães coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D). Os resultados estão expressos como média dos valores de densidade óptica (DO) ± desvio padrão. As letras representam os gráficos: A (IgG), B (IgE).

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 Acompanhamento parasitológico

Durante o experimento observou-se que a cinética da eliminação de L1 nas fezes dos cães infectados por *Angiostrongylus vasorum* e coinfectedados com *A. vasorum* e *Ancylostoma caninum* ocorre de forma contínua, intercalando períodos de alta e baixa eliminação, mas sem um padrão bem definido. Dados que corroboram com os encontrados por Cury (1999), Oliveira-Junior (2003), Barçante (2004) e Mozzer et al. (2011). Durante o período experimental, não houve negatização dos exames parasitológicos das fezes, fato também observado por Oliveira-Junior et al. (2003) e Mozzer et al. (2011).

Segundo Barçante (2004), os picos e declínios observados durante o acompanhamento da cinética de eliminação larvária são decorrentes do processo patológico da infecção, que pode ocasionar a retenção de larvas nos pulmões e conseqüentemente a diminuição de L1 nas fezes. Outro fato que pode levar a uma diminuição e até a negatização do encontro de larvas nas fezes é relatado por Patteson et al. (1993), o autor explica que um dos fatores que pode levar a negatização nos exames é o fato das fêmeas de *A. vasorum* fazerem uma postura intermitente de ovos nos capilares pulmonares.

O acompanhamento da eliminação larvária na angiostrongilose é importante uma vez que em cães naturalmente infectados a carga parasitaria costuma ser baixa, levando a infecções assintomáticas e não diagnosticadas. Os cães podem então eliminar larvas no meio contribuindo para o aumento do número de casos positivos em regiões onde a manutenção do ciclo biológico seja possível, devido à presença de hospedeiros intermediários.

Do mesmo modo observado na eliminação de larvas de *A. vasorum* pelos cães, a eliminação de ovos de *A. caninum* também ocorreu de forma contínua, intercalando períodos de alta e baixa eliminação. No grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo B), observou-se um aumento progressivo no número de OPG até o 43º DPI, sendo que após essa data a eliminação de ovos decaiu, continuando de forma constante e mais estabilizada, com menos picos e declínios. No grupo de cães infectados simultaneamente (Grupo D), também foi observado um aumento progressivo na eliminação de ovos até o 43º DPI, com queda dos valores a partir dessa data.

Os dados deste experimento são semelhantes aos encontrados por Hotez et al. (2002), que ao acompanhar cães infectados com diferentes inócuos de L3 de *A. caninum*, observaram um aumento nas contagens de OPG durante os 35º primeiros dias após a infecção com posterior queda desses valores. O autor também relata que a queda no número de OPG possivelmente está relacionada à expulsão de alguns vermes adultos durante os primeiros dias da infecção promovida por uma resposta bem sucedida do hospedeiro contra o parasito.

## **9.2 Avaliações hematológicas**

### **9.2.1 Hemograma**

A determinação de um quadro anêmico é dependente da avaliação de um conjunto de fatores que entre outros incluiu: valores de hemácias, concentração de hemoglobina e valores de hematócrito.

Nenhum dos cães dos grupos infectados apresentou-se anêmico durante o período de experimental quando comparado com os cães sem infecção. Willesen et al. (2009) acompanhando alterações no perfil hematológico em cães naturalmente infectados por *A. vasorum*, também não relataram anemia em nenhum dos 48 cães avaliados. Porém a maioria dos relatos literários descreve o quadro anêmico como uma importante consequência do processo patológico nas infecções por *A. vasorum* e *A. caninum* (Cury et al. 2002; Hotez et al. 2002; Chapman et al. 2004).

Os valores de hemácias e do hematócrito dos grupos de cães infectados (Grupo B, C e D) mantiveram-se constantes e não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo não infectado (Grupo A). Entretanto, em relação à hemoglobina, os valores médios nos grupos infectados, se mantiveram inferiores aos do grupo não infectado entre o 42º e o 70º dia de acompanhamento, sendo que uma diferença estatística foi observada apenas entre o grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (grupo C) e o de cães não infectados.

Os dados desse trabalho corroboram em parte com os encontrados por Cury et al. (2002). Os autores relataram uma diminuição nos valores de hemoglobina em cães infectados experimentalmente com *A. vasorum* entre os 45º e 130º dia após infecção, porém apenas o

grupo infectado com maior carga larvária (500 L3 por quilo de peso vivo) apresentou diferença estatística com o grupo controle. Uma diminuição dos valores do hematócrito também foi observada nos cães infectados, sem diferença significativa dos cães controle. Segundo os autores na infecção por *A. vasorum* uma leve anemia detectada nos cães e as alterações hematológicas estão relacionadas com o início da eliminação de larvas pelo hospedeiro e pelo começo de manifestações clínicas. Esta relação também foi relatada por Schnyder et al. (2010), porém esses dados diferem dos encontrados nesse trabalho, onde não foram encontradas alterações hematológicas relevantes coincidindo com a patência dos parasitos.

Hotez et al. (2002) avaliando diferentes cargas parasitárias na infecção por *A. caninum* em cães, relataram uma moderada anemia comprovada pelos valores do hematócrito e de hemoglobina que decaem até o 20º dia após a infecção e então voltam a ficar dentro da faixa de referência. A diferença nos dados encontrados pelos Hotez et al. (2002) e os dados desse trabalho pode estar relacionada com a carga parasitária nas infecções, uma vez que o inóculo utilizado pelos autores foi maior que o utilizado neste experimento.

Os valores da concentração média de hemoglobina (CMH) foram menores nos grupos de cães coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum* quando comparados ao grupo de cães infectados somente com *A. vasorum* ou sem infecção a partir do 42º dia de acompanhamento. Cury (1999) explica que a diminuição desses valores pode ser explicada pela influência do parasito ou de seus metabólitos na síntese de hemoglobina.

Os valores da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de todos os grupos infectados foram estatisticamente inferiores aos do grupo de cães sem infecção a partir do 42º dia de acompanhamento. Esses dados revelam discreta hipocromia. Também relatada por Martin et al. (1993), Patteson et al. (1993) em cães naturalmente infectados por *A. vasorum*.

Com relação ao volume corpuscular médio (VCM) não houve diferença estatística entre os grupos. Entretanto os grupos de cães infectados apresentaram valores maiores que o grupo de cães não infectados em alguns dias do experimento. O grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) apresentou macrocitose durante todo período de acompanhamento, exceto nos dias 70 e 112. Os cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) apresentou macrocitose nos dias 0, 28, 42, 84 e 92. Os cães infectados no mesmo dias com

os dois parasitos (Grupo D), apresentaram macrocitose nos dias 56, 84 e 96, estando as hemácias nos demais dias normocíticas. Esses resultados são condizentes com os encontrados por Martín et al. (1993), Patteson et al. (1993), Cury (1999) e Barçante (2004) em cães naturalmente e experimentalmente infectados.

O aumento do volume corpuscular médio em determinados dias pode ser justificado por uma regeneração eritrocitária acelerada. Estímulos para uma maior produção e liberação de reticulócitos pela medula óssea podem estar relacionados à presença dos parasitos, como: habito hematofágico levando a intensa espoliação sanguínea, processos inflamatórios nos pulmões e intestino causando lesão tecidual, podendo originar perdas crônicas de sangue.

### **9.2.2 Leucograma**

Neste trabalho verificou-se, se a infecção por *A. vasorum* e a co infecção por *A. caninum*, induz um aumento no número global de leucócitos no sangue periférico. Nos grupos de cães coinfectados por *A. vasorum* e *A. caninum* (Grupos C e D) houve um aumento na contagem global de leucócitos coincidindo com o início da eliminação de ovos de *A. caninum* nas fezes. Durante a fase aguda das infecções helmínticas, período no qual ocorre a penetração, muda maturação e início da reprodução do parasito, ocorre uma maior liberação de substâncias antigênicas capazes de induzir uma resposta imune no hospedeiro. Esse e outros fatores são responsáveis por um aumento da população de leucócitos tanto no sangue periférico, como no sítio inflamatório (Barçante 2004).

O grupo B, cães infectados apenas por *A. vasorum*, na fase crônica da infecção, juntamente com os grupos coinfectados apresentaram valores da contagem global acima dos valores encontrados no grupo de cães não infectados (Grupo A), durante todo o experimento com exceção do dia 0. Porém apenas os grupos B e D tiveram diferença estatística quando comparados ao grupo A. Esses resultados corroboram os de Bwangamoi (1972), Koch & Jensen (1992), Hotez et al. (2002) e Barçante (2004), mas diferem dos encontrados por Willeesen et al. (2009) e Schnyder et al. (2010).

Na avaliação dos neutrófilos bastonetes circulantes, os valores encontrados no grupo de cães sem infecção (Grupo A) manteve-se constante e dentro da faixa de referência para a espécie durante todo o experimento. O mesmo foi observado para o grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B). Os grupos com cães coinfectados (Grupos C e D)

apresentaram valores significativamente superiores aos grupos A e B, apresentando picos e declínios durante todo o período experimental.

Nas contagens de neutrófilos segmentados circulantes, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos durante o experimento. Nenhum grupo apresentou neutrofilia ou neutropenia. Porém o grupo de cães coinfectados apresentou picos durante o período de acompanhamento. Esses dados diferem dos encontrados por Willesen et al. (2009) e Schnyder et al., (2010), porém corroboram com os encontrados por Patteson et al., (1993), Cury et al. (2002) e Chapman et al. (2004). Oscilações desses dois tipos celulares observadas durante o acompanhamento dos cães se devem a atuação dessas células durante a infecção, pois pode ocorrer marginalização ou migração de neutrófilos segmentados para o sítio de inflamação atraídos por compostos quimiotáticos. Nesse momento a medula óssea libera seu estoque de neutrófilos segmentados, e se a demanda dessas células na circulação for muito grande, ocorre a liberação de neutrófilos bastonetes pela medula óssea, na tentativa de tornar o combate mais eficiente.

O número de linfócitos foi oscilante em todos os grupos durante o período experimental. Porém os valores médios do grupo sem infecção (Grupo A) são significativamente inferiores aos do grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e ao do grupo de cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupo D). O grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) também apresentou valores estatisticamente inferiores aos do grupo B até o 56º dia de acompanhamento. Esses resultados não corroboram com os de Willesen et al. (2009) que avaliando cães naturalmente infectados por *A. vasorum*, observou linfocitose em apenas 10% cães avaliados. Schnyder et al. (2010) também não observou alteração nos valores de linfócitos em cães experimentalmente infectados.

A eosinofilia é um achado comum em infecções parasitárias, principalmente naquelas em que ocorre lesão profunda de tecido. Todos os grupos infectados desse experimento apresentaram eosinofilia durante o período de acompanhamento, com diferença estatística entre o grupo de cães não infectados. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Cury et al. (2002), Hotez et al. (2002), Willesen et al. (2009) e Schnyder et al. (2010). Mishra & Cens (1971) e Cury (1999) encontraram picos de eosinofilia durante o acompanhamento de cães com angiostrongilose, e relacionam a variação desse tipo celular com a migração larvária, crescimento dos parasitos jovens e maturidade sexual dos adultos nos pulmões.

Hotez et al. (2002) relata que a via de infecção de *A. caninum* pode influenciar na carga parasitária nos cães. Da mesma forma, a via de infecção pode influenciar a contagem de eosinófilos. Na infecção por via oral, como realizada neste trabalho, as L3 passam pelo estômago e chegam ao intestino delgado, onde se transformam em jovens adultos e fixam-se à mucosa intestinal. Caso a infecção seja por contato e penetração cutânea, as larvas atingem a circulação sanguínea e são carregadas passivamente para a microcirculação do pulmão. Migrando ativamente pelo sistema respiratório, chegam ao intestino delgado, onde ocorre a implantação dos vermes adultos (Loukas & Provic, 2001). Durante essa migração o hospedeiro terá contato com uma maior quantidade de proteínas e produtos secretórios do parasito, e o aumento de eosinófilos circulantes pode ser um reflexo da hipersensibilidade a esta estimulação antigênica.

Foi observado um aumento no número de monócitos no grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* quando comparado aos demais grupos, porém sem diferenças significativas. Monocitose não é um achado muito comum em infecções por *A. vasorum*. Porém, Chapman et al. (2004) ao estudar 23 cães naturalmente infectados, 25% apresentaram monocitose. Schnyder et al. (2010) também relatam monocitose em cães experimentalmente infectados, mas os autores não consideraram esse achado com um sinal clínico característico da angiostrongilose canina.

Na avaliação de basófilos circulantes, nos grupos de cães coinfectados foi observado um pico desse tipo celular nos 70 dias de acompanhamento. Sabe-se que a presença de basófilos em cães é rara e esta relacionada com condições inflamatórias. Chapman et al., (2004), Willesen et al. (2009) e Schnyder et al. (2010) também relatam um aumento de basófilos em cães experimentalmente e naturalmente infectados.

### **9.2.3 Avaliação das plaquetas**

Os cães não infectados (Grupo A) e os cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C) apresentaram trombocitopenia discreta durante todo o período experimental com valores significativamente inferiores aos dos grupos de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B) e de cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupo D). Os dados encontrados estão de acordo com Cury et al. (2002), Chapman et al. (2004) e Schnyder et al. (2010). Hotez et al. (2002) também relata uma trombocitopenia moderada em cães infectados com *A. caninum* infectados com diferentes cargas larvárias.

O mecanismo exato da coagulopatia na angiostrongilose tem sido relatado inúmeras vezes na literatura, mas ainda não foi completamente elucidado.

### **9.3 Pesos dos cães**

O grupo de cães não infectados apresentou ganho de peso médio ao final do experimento, apesar desse ganho não ser significativo quando comparado com o ganho ou perda dos outros grupos. Os cães com angiostrongilose crônica não apresentaram perda de peso como relato por Curry (1999), Barçante (2004) e Soares (2010). Esse fato pode estar relacionado à baixa carga larvária utilizada na infecção experimental, que resultou em uma infecção assintomática nos cães. Esses dados são condizentes com os de Schnyder et al. (2010) que relataram que a carga larvária utilizada em infecções experimentais influencia nas manifestações clínicas. Segundo os autores, a perda de peso entre cães infectados com 50 e 500 L3 de *A. vasorum* foi significativamente diferente, onde os cães infectados com inócuo menor não apresentaram manifestações clínicas.

Dentre os grupos com infectados com *A. vasorum*, o único grupo que apresentou queda no peso médio final foi o grupo de cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* (Grupo C). Esse resultado corrobora com os encontrados por Curry (1999), Barçante (2004) e Soares (2010) e com os encontrados por Hotez et al. (2002), onde cães infectados com 800 L3 de *A. caninum* apresentaram emagrecimento e anorexia.

### **9.4 Ensaio de proliferação celular**

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram os efeitos de co-infecções helmínticas na resposta celular em cães.

A proliferação das células mononucleares do sangue periférico dos cães em resposta aos antígenos bruto dos parasitos não apresentou diferença estatística nos vários grupos estudados. O grupo de cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com larvas de *A. caninum* (Grupo C), apresentou uma menor taxa de proliferação em relação aos demais grupos, porém sem diferença estatística.



De forma semelhante, os resultados encontrados por Geiger et al. (2004), demonstram que PBMCs de pacientes infectados com *N. americanus*, se tornaram menos sensíveis aos antígenos do parasito e apresentam uma menor proliferação quando comparado as células de pacientes não infectados da mesma área endêmica, estimuladas com antígeno de *A. caninum*, porém sem diferença significativa. Segundo o autor essa redução nos valores observados pode ser explicada por uma modulação na resposta celular.

Esse fenômeno também foi observado por Mendez et al. (2005) que demonstraram uma redução na taxa de proliferação de células de linfonodos e baço de hamsters infectados com *A. ceylanicum*. Os linfócitos e esplenócitos estimulados com antígenos de larva e vermes adultos apresentaram redução na proliferação quando comparados às células não estimuladas. Segundo os autores, essa imunomodulação pode estar associada ao estabelecimento de uma resposta do tipo Th2 e a produção da citocina IL-10 pelo hospedeiro após o estabelecimento de parasitos adultos e início da patencia.

Vários relatos na literatura citam essa imunossupressão associada com a infecção por ancylostomídeos, inclusive em populações humanas de áreas endêmicas (Loukas & Provic, 2001; Onyemelukwe & Musa, 2001). Outros autores demonstraram a capacidade que algumas moléculas do parasito possuem de induzir apoptose em células efectoras do hospedeiro (Gazzinelli-Guimarães, 2011).

Essa supressão celular já foi relatada em outras infecções helmínticas (Riffkin et al. 1996; Geiger et al. 2002; Geiger et al. 2007) e é atribuída a uma estratégia de sobrevivência do parasito e evasão da resposta imune do hospedeiro. O mecanismo pelo qual o parasito consegue modular a resposta celular ainda não é totalmente esclarecido (Fujiwara et al. 2006). Portanto, todos esses fatores sugerem explicações para os dados encontrados neste trabalho, onde uma diminuição na proliferação de células dos cães infectados, quando estimuladas com antígeno de *A. caninum*, foi observada.

Para os cães com angiostrongilose, não infectados por *A. caninum* (Grupo B), também pode ocorrer uma modulação constante da resposta imune do hospedeiro pelo parasito. Os dados encontrados sugerem que a infecção não promove uma resposta celular significativa, uma vez que não foi observada uma proliferação no ensaio realizado. Mais estudos são

necessários para melhor observar esse aspecto da interação parasito-hospedeiro durante a infecção.

É importante ressaltar que este trabalho é o primeiro relato na literatura demonstrando o comportamento de PBMCs de cães, infectados com *A. vasorum* e coinfectados com *A. vasorum* e *A. caninum*, estimuladas *in vitro* com antígenos dos parasitos.

### **9.5 Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de culturas e no plasma de cães**

Citocinas são proteínas que atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune frente a um antígeno. As citocinas presentes no plasma dos cães servem como parâmetro para a análise da resposta imune sistêmica no cão. Entretanto, ao analisarmos a produção de citocinas frente a estímulo antigênico do parasito podem-se perceber, se há uma resposta imune específica do hospedeiro contra o parasito.

No plasma dos cães do grupo B, com angiostrongilose crônica, foi observado um perfil misto de citocinas do tipo Th1 e Th2. Entretanto ao analisar a produção dessas citocinas no sobrenadante de culturas estimuladas com antígeno bruto de *A. vasorum*, foi observado apenas citocinas do tipo Th2 sendo produzidas (IL-4 e IL-10).

Mais uma vez, é importante ressaltar que não foram encontrados relatos na literatura sobre a produção de citocinas durante a infecção por *A. vasorum*. Entretanto, os dados obtidos nesse trabalho corroboram com relatos da literatura que indicam infecções helmínticas normalmente induzindo uma resposta imune do tipo Th2 no hospedeiro levando à proteção contra patógenos, (Negrão-Corrêa, 2001; MacDonald et al. 2002; Fuwijara et al. 2006).

Alguns trabalhos foram realizados visando acompanhar a cinética da produção de citocinas durante a infecção de outros parasitos do gênero *Angiostrongylus* em camundongos.

Geiger et al. 2001 estudaram a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-5, IL-2 E IFN- $\gamma$  em sobrenadante de culturas de células do baço de diferentes linhagens de camundongos infectados com *Angiostrongylus costaricensis*. Os autores observaram que em culturas estimuladas com mitógeno (Concavalina A) uma maior produção de IL-4 e IL-10 ocorrem a

partir do 7º dia pós infecção (DPI) e que a produção máxima de IL-5 ocorre ao 21º DPI. Enquanto IL-2 e IFN- $\gamma$  apresentam um pico de produção entre o 14º e 28º DPI. Porém, em culturas estimuladas com antígeno bruto de *Angiostrongylus costaricensis* apenas níveis marginais foram encontrados para todas as citocinas. Os autores descrevem a presença de resposta imunológica mista durante a infecção.

Posteriormente, Sugaya et al. 1997 avaliaram a produção de citocinas IL-5, IL-4, IL-2 e IFN- $\gamma$  *in vitro* e *in vivo* em diferentes linhagens de camundongos infectados com *Angiostrongylus cantonensis*. Os autores relatam que na análise do fluido cefalorraquidiano um aumento nos níveis de IL-5 pode ser detectado a partir do 12º dia pós infecção (DPI) e de IL-4 a partir do 20º DPI, enquanto IL-2 e IFN- $\gamma$  apresentam níveis basais durante todo o período experimental. Na análise de sobrenadante de culturas de células do baço e de linfonodos cervicais um aumento nos níveis de IL-5 e IL-4 é observado a partir do 20º e 30º DPI respectivamente. IL-2 apresentou níveis basais e IFN- $\gamma$  não foi detectado. A análise do soro dos camundongos relevou-se negativa para todas as citocinas. Segundo os autores uma resposta do tipo Th2 é predominante em camundongos infectados por *A. cantonensis*. Esses dados demonstram um padrão de resposta imune semelhante ao encontrado neste experimento.

No grupo de cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum*, grupo C, a análise das citocinas presentes no plasma dos cães também revelou um perfil misto de Th1 e Th2. Ao analisar as citocinas produzidas nas culturas celulares estimuladas com antígenos dos dois parasitos, pode-se perceber citocinas do tipo Th1 (TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23p40 e IFN- $\gamma$ ) sendo produzidas em resposta apenas ao antígeno de *A. caninum* e uma produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) em resposta a ambos os parasitos.

Resultados semelhantes foram observados no grupo D, cães infectados simultaneamente com *A. vasorum* e *A. caninum*. Nos dois pontos de avaliação deste grupo, após o início do PPP de *A. caninum* e após o início do PPP de *A. vasorum*, a análise do plasma dos cães revelou um perfil misto de citocinas do tipo Th1 e Th2. Entretanto a análise do sobrenadante das culturas celulares estimuladas com os antígenos dos parasitos, demonstrou uma produção predominante de citocinas do tipo Th2 em resposta específica a ambos os parasitos.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Geiger et al. (2004). Segundo o autor a infecção por ancilostomídeos em humanos residentes em áreas endêmicas do parasito, promove uma elevada produção de TNF- $\alpha$  (citocina do tipo Th1) em culturas celulares estimuladas com antígeno do parasito, em resposta a inflamação intestinal decorrente da infecção. Altos níveis de IL-10 (citocina do tipo Th2), também foram encontrados no sobrenadante de culturas celulares, evidenciando a sua capacidade de regular a resposta inume celular durante os processos patológicos.

O mesmo perfil foi observado neste trabalho, foi observado por Mendez et al. 2005 que relatou que em hamsters infectados experimentalmente com *A. Ceylanicum*, existe um perfil transitório de citocinas do tipo Th1 com altos níveis de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e baixos níveis de IL-4 durante a pré patencia (sete dias pós infecção) caracterizando uma resposta inflamatória. Durante a patencia foi observada uma mudança no perfil de citocinas com um aumento dos níveis de IL-4 e especialmente de IL-10 e regulação das demais citocinas analisadas, polarizando para uma resposta do tipo Th2.

Os resultados deste trabalho também coincidem com os de Fujiwara et al. 2006, que evidenciaram uma resposta do tipo Th2 em cães vacinados com L3 de *A. caninum* irradiadas. Após a vacinação, elevados níveis de IL-4 e IFN- $\gamma$  foram observados em culturas de PBMCs estimuladas com antígeno bruto de L3. Segundo os autores, uma resposta do tipo Th2 é necessária para gerar uma proteção imunológica às larvas do parasito durante o início da infecção.

### **9.6 Fenotipagem de leucócitos do sangue periférico *ex vivo* por citometria de fluxo**

Com a avaliação de marcadores de superfície celular foi possível identificar o fenótipo dos leucócitos do sangue periférico dos cães por citometria de fluxo. A fenotipagem das células de defesa circulantes no sangue é importante, pois fornece informações sobre a resposta imune do hospedeiro gerada contra os antígenos do parasito durante a infecção.

A análise dos dados referente à fenotipagem dos leucócitos demonstrou não haver diferença significativa entre as subpopulações de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD21<sup>+</sup>) e monócitos (CD14<sup>+</sup>) nos grupos do experimento ( $p > 0.05$ ).

No grupo de cães com angiostrongilose crônica (Grupo B), grupo de cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum* (Grupo C) e no grupo de cães infectados simultaneamente com os dois parasitos (Grupo D) foi observada uma maior predominância de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) em relação à porcentagem de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), embora sem diferença significativa entre esses valores. Esses resultados corroboram com os encontrados por Barçante (2006), que também observou um maior percentual na subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> na angiostrongilose canina.

Apenas o Grupo C apresentou uma redução significativa na população de células T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) circulantes quando comparado aos cães não infectados do Grupo A (p=0.0378). De forma semelhante, Fujiwara et al. 2006, avaliando os efeitos de uma vacina com larvas L3 irradiadas de *A. caninum* em cães, relatam uma queda significativa na porcentagem da população de linfócitos T e um aumento na porcentagem da população de linfócitos B em cães vacinados quando comparados a cães não vacinados. Segundo o autor, a diminuição na porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico desses cães, pode estar associada à migração desse subtipo celular para pontos de infecção como pulmão e intestino.

Esse processo de migração de células T (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) para sítios de inflamação durante a resposta imune pode também estar ocorrendo nos cães desse grupo, uma vez que a porcentagem de outros tipos celulares no sangue periférico não diminuiu (Fuwijara et al. 2006, Ding et al. 2012).

### **9.7 Determinação da produção de anticorpos específicos frente a antígeno bruto solúvel de *A. vasorum* e *A. caninum***

Os anticorpos, proteínas produzidas em resposta à um antígeno específico, desempenham um papel importante nos mecanismos de imunidade. Neste experimento um ponto de avaliação foi escolhido para se determinar os anticorpos que estão sendo produzidos e liberados na circulação durante a infecção experimental por *A. vasorum* e *A. caninum* em cães.

Em relação a análise de IgG reativo a antígenos de *A. vasorum*, esta imunoglobulina apresentou níveis séricos mais elevados na fase aguda da infecção por *A. vasorum*, como pode ser observado no Grupo D, cães infectados simultaneamente com os dois parasitos,

quando comparado aos demais grupos do experimento, apesar de não haver diferença estatística entre esses valores. Ainda neste grupo foi possível acompanhar o aumento do nível de IgG no último ponto de avaliação do grupo (após o PPP de *A. caninum* e o PPP de *A. vasorum*) quando comparado ao primeiro ponto de avaliação (antes da infecção dos cães) ( $p=0.0239$ ). (Figura 5)

Já nos Grupo B e C, cães com angiostrongilose crônica e cães com angiostrongilose crônica que foram infectados com *A. caninum*, os valores de IgG reativos aos antígenos de *A. vasorum*, não foram significativamente diferentes dos valores encontrados no grupo de cães não infectados, Grupo A, e no grupo de cães na fase aguda da angiostrongilose, Grupo D. Esses resultados sugerem que apesar da queda nos níveis desse anticorpo verificados na fase crônica da angiostrongilose canina, essa diferença da fase aguda não é significativa, e essa imunoglobulina está sendo produzida ao longo de todo o curso da infecção.

Em relação à detecção de IgE reativos a antígenos de *A. vasorum*, uma maior produção dessa imunoglobulina foi detectada na fase crônica da infecção. No grupo D, fase aguda da infecção podemos perceber um aumento progressivo nos níveis séricos detectados, mas sem diferença significativa quando comparado aos níveis do grupo de cães não infectados, Grupo A. Já em cães na fase crônica, Grupos B e C, podemos ver um aumento significativo nos níveis de IgE circulantes no plasma. Não foi observado uma reatividade significativa nos níveis de IgG e IgE a antígenos de *A. caninum* em nenhum dos grupos experimentais. E a coinfeção por *A. caninum*, não influenciou a produção de IgG e IgE nos cães com angiostrongilose crônica.

Os resultados encontrados nesse experimento corroboram em parte com os descritos por Barçante (2004). Segundo o autor, níveis semelhantes de IgG são produzidos na fase aguda e na fase crônica da angiostrongilose canina, e a cinética dessa imunoglobulina apresenta uma tendência à cronicidade. Entretanto os resultados deste trabalho em relação aos níveis de IgE, não corroboram com os encontrados por Barçante (2004). Enquanto no nosso trabalho foi observado uma maior produção de IgE na fase crônica da infecção, a autora observou níveis superiores durante a fase aguda.

Em infecções por ancilostomídeos em diversos modelos experimentais, inclusive em cães, diversos trabalhos relatam que nas primeiras semanas ocorre um aumento nos níveis de IgM

enquanto que no decorrer da infecção os níveis decaem e ocorre um aumento de IgG circulante que se mantém durante toda a infecção. IgE é relatado como uma imunoglobulina que confere resistência à infecção, assim como IgA (Loukas et al. (2005); Fujiwara et al. (2006); McSorley & Loukas (2010) ).

## 10. CONCLUSÕES

- A cinética de eliminação de L1 por grama de fezes em cães coinfectados por *Angiostrongylus vasorum* e *Ancylostoma caninum* é reduzida quando comparada a eliminação em cães infectados apenas por *A. vasorum*.
- Cães parasitados por *A. vasorum* ou coinfectados com *A. caninum* podem ser assintomáticos, no entanto podem contaminar o ambiente e constituem uma fonte de infecção para outros animais e para o homem.
- A coinfeção por *A. vasorum* e *A. caninum* pode ocasionar a diminuição da concentração média de hemoglobina e da concentração de hemoglobina corpuscular média
- A coinfeção por *A. vasorum* e *A. caninum* leva a um aumento da contagem global de leucócitos no sangue periférico dos cães.
- A resposta celular durante a infecção crônica por *A. vasorum* é caracterizada pelo aumento no número de linfócitos e eosinófilos, enquanto a coinfeção por *A. vasorum* e *A. caninum* é caracterizada por um aumento no número de neutrófilos bastonetes, linfócitos e eosinófilos.
- Cães com angiostrongilose crônica infectados com *A. caninum* apresentam trombocitopenia mais evidente que cães somente infectados por *A. vasorum* na fase crônica da infecção.
- Não há diferença significativa na proliferação entre células de cães não infectados e células de cães mono ou coinfectados estimuladas com antígeno bruto de *A. vasorum* ou *A. caninum*.
- Cães mono infectados por *A. vasorum* apresentam um perfil do tipo Th2 da resposta imune. E cães coinfectados por *A. vasorum* e *A. caninum* apresentam um perfil misto de Th1 e Th2 da resposta imune.



- Cães infectados por *A. vasorum* apresentam um maior percentual de linfócito T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico do que o percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, linfócito B CD21<sup>+</sup> e monócitos CD14<sup>+</sup>. O mesmo é observado em cães coinfectados.
- A imunoglobulina IgG, específica para antígeno de *A. vasorum*, é produzida durante todo o curso da angiostrongilose canina, entretanto, em maiores níveis durante a fase aguda. A imunoglobulina IgE, específica para antígeno de *A. vasorum*, é produzida em maiores níveis durante a fase crônica da infecção. A coinfeção por *A. caninum* não altera esse perfil imunológico.

## 11. REFERÊNCIAS

Acedo, C.S.; Diez, J.B.; Morales, J.G. 1979. Angiostrongylosis canina. Ver. Iber. Parasitol. 39: 135-142.

Alicata, J.E. 1988. *Angiostrongylus cantonensis* (eosinophilic meningitis): historical event in its recognition as a new parasitic disease of man. J. Washington Acad. Sci. Parasitol. 39: 135-14.

Baillet, C. 1866. Strongle des vaisseaux et du coeur Du chien. N. Dict. Paract. Med. Vet. 8: 587-588.

Barçante, J.M.P. 2004. Aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 176 pp.

Bessa, E.C.; Lopes, C.W.G.; Pinheiro, N.L.; Araujo, J.L.B. 1996. Sítios de desenvolvimento de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: protostrongylidae) em *Subulina octona* (Bruguière, 1789) (MOLUSCA: Subulinidae) em condições de laboratório. Bol. Inst. Ciênc. Biol. 47: 13-19.

Bolt, G.; Monrad, J.; Frandsen, F.; Henriksen, P.; Dietz, H.H. 1993. The common frog (*Rana temporaria*) as a potencial paratecnic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. Parasitol. Res. 79(5): 428-430.

Bolt, G.; Monrad, J.; Koch, J.; Jensen, A.L. 1994. Canine angiostrongylosis: a review. Vet. Rec. 135: 447-452.

Bourdeaux, P. 1993. L'angiostrongylose canine. Rev. Méd. Vét. 5/6: 401-407.

Burrows, R.B. 1962. Comparative morphology of *Ancilostoma tubaeforme* (Zeder, 1800) and *Ancilostoma caninum* (Ercolani, 1859). J. Parasitol. 48(5): 715-718.

Bwangamoi, O. 1972. *Angyostrongylus vasorum* and other worms in dogs in Uganda. Vet. Rec. 19: 267.

Cantó, G.J.; García, M.P.; García, A.; Guerrero, M.J.; Mosqueda, J. 2011. The prevalence and abundance of helminth parasites in stray dogs from the city of Queretaro in central Mexico. J. Helminthol. 85(3): 263-269.

Carroll, S.M.; Grove, D.I. 1984. Parasitological, hematologic, and immunologic responses in acute and chronic infections of dogs with *Ancylostoma ceylanicum*: a model of human hookworm infection. J. Infect. Dis. 150(2): 284-94.

Chapman, P.S.; Boag, A.K.; Guitian, J.; Boswood, A. 2004. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). J. Small Anim. Pract. 45: 435-440

Cobb, M.A.; Fisher, M.A. 1990. *Angiostrongylus vasorum*: transmission in South East England. Vet. Rec. 126(21): 529.

Coelho, L.M.; Dini, C.Y.; Milman, M.H.; Oliveira, S.M. 2001. Eggs in public squares of Sorocaba, São Paulo state, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 43: 189-191.

Costa, J.O.; Araujo Costa, H.M.; Guimaraes, M.P. 2003. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951. Revue Med. Vet. 154(1): 9-16.

Costa, J.O.; Taffuri, W.L. 1997. Estudo anátomo-patológico de cães infectados experimentalmente pelo *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec. 49: 389-407.

Cury, M.C. 1999. Avaliação das alterações sanguíneas, hepáticas, renais, pulmonares e cardíacas em cães inoculados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum* (Baillet 1866) Kamensky, 1905. Tese de doutorado, Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 206 pp.

Cury, M.C.; Guimarães, M.P.; Lima, W.S.; Caldeira, M.C.; Couto, T.R.; Murta, K.; Carvalho, M.G.; Baptista, J.M. 2005. Biochemical serum profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet. Parasitol.* 128: 121–127.

Cury, M.C.; Lima, W.S. 1996. Aspectos clínicos de cães infectados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum*. *Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec.* 48: 27-34.

Cury, M.C.; Lima, W.S.; Guimarães, M.P.; Carvalho, M.G. 2002. Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Vet. Parasitol.* 104: 139–149.

Ding, Y.; Xu, J.; Bromberg, J.S. 2012. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends Immunol.* 1-7.

Dodd, K. 1973. *Angiostrongylus* (Baillet, 1866) Infestation in a Greyhound Kennels. *Vet. Rec.* 24: 195-197.

Duarte, F.H.; Vieira, F.M.; Louzada, G.L.; Bessa, E.C.A.; Souzalima, S. 2007. Occurrence *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) (Nematoda, Angiostrongylidae) in *Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766 (Carnivora, Canidae) in Minas Gerais State Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(4): 1086-1088.

Eckert, J.; Lammler, G. 1972. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. *Z. Parasitenk.* 39: 303-322.

Edney, A.T. 1995. Companion animals and human health: an overview. *J. R. Soc. Med.* 88(12): 704-708.

Fehring, W.T.; Fiedler, H.H. 1977. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. *Arq. Esc. Med. Vet. Salvador* 2: 110-114.

Fujiwara, R.T.; Geiger, S.M.; Bethony, J.; Mendez, S. 2006. Comparative immunology of human and animal models of hookworm infection. *Parasite Immunol.* 28: 285-293.

Fujiwara, R.T.; Loukas, A.; Mendez, S.; Williamson, A.L.; Bueno, L.L.; Wang, Y.; Samuel, A.; Zhan, B.; Bottazzi, M.E.; Hotez, P.J.; Bethony, J.M. 2006. Vaccination with irradiated *Ancylostoma caninum* third stage larvae induces a Th2 protective response in dogs. *Vaccine*. 26: 501-509.

Gazzinelli Guimarães, P.H. 2010. Atividade citotóxica e pró-apoptótica de antígenos de *Ancylostoma ceylanicum*: implicações na modulação da resposta imune na ancilostomíase. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 97 pp.

Geiger, S.M.; Abrahams-Sandi, E.; Soboslay, P.T.; Hoffmann, W.H.; Pfaff, A.W.; Graeff-Teixeira, C.; Schulz-Key, H. 2001. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Trop.* 80(1): 59-68.

Geiger, S.M.; Caldas, I.R.; Mc Glone, B.E.; Campi-Azevedo, A.C.; De Oliveira, L.M.; Brooker, S.; Diemert, D.; Correa-Oliveira, R.; Bethony, J. 2007. Stage-specific immune responses in human *Necator americanus* infection. *Parasite Immunol* 29: 347-58.

Geiger, S.M.; Massara, C.L.; Bethony, J.; Soboslay, P.T.; Carvalho, O.S.; Corrêa-Oliveira, R. 2002. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoide* and *Trichuris trichiura* infected patients. *Parasit. Immunol.* 24: 499-509.

Geiger, S.M.; Massara, C.L.; Bethony, J.; Soboslay, P.T.; Correa-Oliveira, R. 2004. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin. Exp. Immunol.* 136: 334-40.

Giovanonni, M.; Fernandez, B.F.; Kavinsky, L.C. 1985. Angiostrongilose do cão. *Arq. Biol. Tec. Paraná* 28(4): 601-604.

Gonçalves, P.C. 1961. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) novo parasita do cão do Rio Grande do Sul (Brasil). (Nematoda: Metastrongyloidea). *Rev. Agron. Vet. Univ. Rio Grande do Sul.* 4(1): 35-40.

Gordon, H.McL.; Whitlock, H.V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J. Counc. Sci. Indian Res. 12(1): 50-52.

Guillot, J.; Bouree, P. 2007. Zoonotic worms from carnivorous pets: risk assessment and prevention. Bull Acad Natl Med. 191(1): 67-81.

Guimarães, A.M.; Alves, E.G.; de Rezende, G.F.; Rodrigues, M.C. 2005. *Toxocara* sp. eggs and *Ancylostoma* sp. larva in public parks, Brazil. Rev. Saude. Publica. 39(2): 293-5.

Hotez, P.; Zhan, B.; Qun, J.; Hawdon, J.M.; Young, H.A.; Simmens, S.; Hitzelberg, R.; Zook, B. 2002. Natural history of primary canine hookworm infections following 3 different oral doses of third-stage infective larvae of *Ancylostoma caninum*. Comp. Parasitol. 69: 72-80.

Incáni, R.N.; Caldeiras, E.; Martín, M.; Gongonzález, C. 2007. Human infection by *Angiostrongylus costaricensis* in Venezuela: First report of a confirmed case. 49(3): 197-200.

Jacobs, D.E.; Prole, J.H.B. 1975. "*Angiostrongylus vasorum* and other nematodes in British greyhounds. Vet. Rec. 22: 180.

Jennings, L.B. 1997. Potencial benefits of pet ownership in health promotion. J. Holistic Nursing. 15(4):358-372.

Jones, G.W.; Neal, C.; Turner, G.R. 1980. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in Cornwall. Vet. Rec. 26: 83.

Kalkofen, U.P. 1992. Hookworm in dogs and cats. Vet. Clin. North Am. 17: 1341-1352.

Klimpel, S.; Heukelbach, J.; Pothmann, D.; Rückert, S. Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for humans? Parasitol. Res. 107(3): 713-719.

Koch, J.; Jensen, A.L.; Monrad, L. 1992. *Angiostrongylus vasorum* infected in a Scottish terrier associated with gastric dilation. J. Small Anim. Pract. 33: 239-241.

- Lima, W. S. 2011. "Larva Migrans". *In*: Neves, D. V., editor. *Parasitologia Humana*. 12 ed. Atheneu. São Paulo. 291-294 p.
- Lima, W.S.; Araujo Costa, H.M.; Guimarães, M.P.; Leite, A.C. 1985. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 80(2): 233-235.
- Lima, W.S.; Guimaraes, M.P.; Lemos, I.S. 1994. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. *J Helminthol*. 68(1): 87.
- Lindemann, B.; Liu, J.; Gao, J.; Zhou, C. 2011. A Case Report on Eosinophilic Meningitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *International Journal of Medical Sciences* 8(6): 510-513.
- Loukas, A.; Constant, S.L.; Bethony, J.M. 2005. Immunobiology of hookworm infection. *Immunol. Med. Microbiol*. 43: 115-24.
- Loukas, A.; Provic, P. 2001. Immune responses in hookworm infections. *Clin. Microbiol. Rev*. 14(4): 689-703.
- Lynch, Y. 1977. *Angiostrongylus vasorum* in the dog. *Vet. Rec*. 101: 41-42.
- Mabaso, M.L.; Appleton, C.C.; Hughes, J.C.; Gouws, E. 2003. The effect of soil type and climate on hookworm (*Necator americanus*) distribution in KwaZulu-Natal, South Africa. *Trop. Med. Int. Health*. 8(8): 722-7.
- MacDonald, A.S.; Araujo, M.I.; Pearce, E.J. 2002. Immunology of parasitic helminth infections. *Infect. Immun*. 70(2): 427-433.
- Mahaffey, M.B.; Losonky, J.M.; Prestowook, A.K.; Mahaffey, E.A.; Lewis, R.E. 1981. Experimental canine Angiostrongylosis: II. Radiographic manifestation. *J. Am. Anim. Hos. Assoc*. 17: 499-502.
- Martin, M.W.S.; Ashton, G.; Simpson, B.R. 1993. Angiostrongylosis in Cornwall: clinical presentations of eight cases. *Journal of Small Animal Practice*. 17: 20-25

Meeusen, E. N.; Balic, A. 2000. Do eosinophils have a role in the Killing of helminth parasites? *Parasitol. Today.* 16: 95-101.

Mendez, S.; Valenzuela, J.G.; Wu, W.; Hotez, P.J. 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect. Immun.* 73: 3402-7.

Migaud, P.; Marty, C.; Chartier, C. 1992. What is your diagnosis? *Angiostrongylus vasorum* infection in dog. *Point. Vet.* 23(141): 989-991.

Mishra, G.S.; Cens, B. 1971. Eosinophilic variations and elephoretic analysis of plasma of dogs infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Indian Vet. J.* 48: 614-617.

Mozzer, L.R.; Montresor, L.C.; Vidigal, T.H.; Lima, W.S. 2001. *Angiostrongylus vasorum*: Experimental Infection and Larval Development in *Omalonyx matheroni*. *J. Parasitol. Res.* 2011: 1-4.

Negrão-Corrêa, D. 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: Looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 43(3): 291-299.

Oliveira-Junior, S.D. 2003. Avaliação de aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos de cães reinfetados na fase crônica da angiostrongilose. Tese mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 137pp.

Oliveira-Sequeira, T.C.; Amarante, A.F.; Ferrari, T.B.; Nunes, L.C. 2002. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 103: 19-27.

Onyemelukwe, G.C.; Musa, B.O 2001. T-lymphocyte subsets in patients with hookworm infection in Zaria, Nigeria. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 30(4): 255-9.

Padgett, G.A.; Patterson, M.W.; Gibbs, C.; Wotton, P.R.; Day, M.J. 1993. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. *Vet. Rec.* 133(23): 565-570.



Pennisi, M.G.; Niutta, P.P.; Giannetto, S. Parasitos pulmonares en el gato. 1994. Med. Vet. 11: 568-572.

Perry, A.W.; Hertling, R.; Kennedy, M.J.; 1991. Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. Can. Vet. J. 32: 430-431.

Pit, D.S.; Polderman, A.M.; Baeta, S.; Schulz-Key, H.; Soboslay, P.T. 2001. Parasite-specific antibody and cellular immune responses in human infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. Parasitol. Res. 87: 722-9.

Poli, A.; Arispici, M.; Marconcini, A.; Mancianti, F.; de Monte, D. 1984. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in red foxes (*Vulpes vulpes L.*) in Italy. J Wildl Dis. 20(4): 345-6.

Popiołek, M.; Szczesna, J.; Nowaka, S.; Mysłajeka, R.W. 2007. Helminth infections in faecal samples of wolves *Canis lupus L.* from the western Beskidy Mountains in southern Poland. J. Helminthol. 81(4): 339-344.

Prestwood, A.K.; Greene, C.E.; Mahhaffey, E.A.; Burges, D.E. 1981. Experimental canine angiostrongylosis: pathologic manifestation. II. Radiographic manifestation. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 17: 491-497.

Provic, P.; Croese, J. 1990. Human eosinophilic enteritis caused by a dog hookworm *Ancylostoma caninum*. Lancet. 335: 1299-1302.

Provic, P.; Croese, J. 1996. Human enteric infection with *Ancylostoma caninum*: hookworms reappraised in the light of a new zoonosis. Acta Trop. 62: 23-44.

Quinnell, R. J.; Pritchard, D. I.; Raiko, A.; Brown, A.P.; Shaw, M.A. 2004. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. J. Infect. Dis. 190: 430-438.

- Raina, P.; Waltner-Toews, D.; Bonnet, B.; Woodward, C.; Abernathy, T. 1999. Influence of companion animals on the physical and psychological health of older people: an analysis of a one-year longitudinal study. *Journal of the American Geriatrics Society* 47(3): 323–329.
- Ramsey, P.M.; Littlewood, J.D.; Dunn, J.K.; Herrtage, M.E. 1996. Role of chronic disseminated intravascular coagulation in a case of canine angiostrongylosis. *Vet. Rec.* 138: 360-363.
- Riffkin, M.; Seow, H.F.; Jackson, D.; Brown, L.; Wood, P. 1996. Defence against the immune barrage: helminth survival strategies. *Immunol. Cell. Biol.* 74(6): 564-74.
- Roberts, F.H.S. 1940. Notes on some helminthes infesting domestic animals in Queensland. *Austral. Vet. J.* 16: 30-33.
- Roche, M.M.; Kelliher, D.J. 1968. *Angiostrongylus vasorum* infestation in the dog: A case report. *Irish Vet. J.* 22: 108-113.
- Rodriguez, R.; Dequi, R.M.; Peruzzo, L.; Mesquita, P.M.; Garcia, E.; Fornari, F. 2008. Abdominal angiostrongyliasis: report of two cases with different clinical presentations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 50(6): 339-41.
- Rosen, L.; Ash, L.R.; Wallace, G.D. 1970. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). *Am J Vet Res.* 31(1): 131-143.
- Saeed, I.; Maddox-Hyttel, C.; Monrad, J.; Kapel, C.M.O. 2006. Helminths of red Fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Vet. Parasitol.* 139: 168-179.
- Sawanyawisuth, K.; Takahashi, K.; Hoshuyama, T.; Sawanyawisuth, K.; Senthong, V.; Limpawattana, P.; Intapan, P.M.; Wilson, D.; Tiamkao, S.; Jitpimolmard, S.; Chotmongkol, V. 2009. Clinical Factors Predictive of Encephalitis Caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(4): 698–701.

Schnyder, M.; Fahrion, A.; Riond, B.; Ossent, P.; Webster, P.; Kranjc, A.; Glaus, T.; Deplazes, P. 2010. Clinical, laboratory and pathological findings in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 107(6): 1471-80.

Segovia, J.M.; Torres, J.; Miguel, J.; Llaneza, L.; Feliu, C. 2001. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. *J Helminthol.* 75(2): 183-192.

Serres, E. 1854. Entozoaires trouvés dans o'oirelette droitt Du coeur, Le ventricule correspondant et l'artère pulmonaire dun chein. *J. Vet. Midi. (Toulouse)* 2: 70-72.

Simpson, V.R. 1996. *Angiostrongylus vasorum* infection in foxes (*Vulpes vulpes*) in Cornwall. *Vet. Rec.* 139: 443-445.

Simpson, V.R.; Neal, C. 1982. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs and slugs. *Vet. Rec.* 111: 303-304.

Smith, O.L. 1985. Angiostrongylosis in a greyhound. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 186(10): 1101-1103.

Soares, L.R.M. 2010. Desenvolvimento dos estádios evolutivos de *Angiostrongylus vasorum* em moluscos do gênero *Omalonyx* e aspectos clínicos da angiostrongilose em *Canis familiaris*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 98 pp.

Souza, J.G.; Simões, R.O.; Thiengo, S.A.; Lima, W.S.; Mota, E.M.; Rodrigues-Silva, R.; Lanfredi, R.M.; Maldonado, A. Jr. 2009. *J Parasitol.* 95(6): 1507-11.

Sugaya, H.; Aoki, M.; Abe, T.; Ishida, K.; Yoshimura, K. 1997. Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol. Res.* 83: 10-15

Thiengo, S.C. 1996. Mode of infection of *Sarasinula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 91(3): 277-278.

- Tomono, N.; Anantaphruti, M.T.; Jongsuksuntigul, P.; Thongthien, P.; Leerapan, P.; Silapharatsamee, Y.; Kojima, S.; Looareesuwan, S. 2003. Risk factors of helminthiases among schoolchildren in southern Thailand. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 34(2): 264-8.
- Torres, J.; Feliu, C.; Fernández-Morán, J.; Ruíz-Olmo, J.; Rosoux, R.; Santos-Reis, M.; Miquel, J.; Fons, R. 2004. Helminth parasites of the eurasian otter *Lutra lutra* in southwest Europe. *J Helminthol* 78(4): 353-359.
- Traub, R.J.; Robertson, I.D.; Irwin, P.J.; Mencke, N.; Thompson, R.C. 2005. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India. *Trends Parasitol.* 21(1): 42-8.
- Travassos L. 1927. Nematódeos novos. *Bol. Biol. São Paulo.* 6: 52-61.
- Traversa, D.; Torbidone, A.; Malatesta, D.; Guglielmini, C. 2008. Occurrence of fatal canine *Angiostrongylus vasorum* infection in Italy. *Vet. Parasitol.* 153(1-2): 162-166.
- Vasconcellos, M.C.; Barros, J.S.L.; Oliveira, C.S. 2006. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ. *Rev. Saúde Pública.* 40(2): 321-323.
- Willesen, J.L.; Jensen, A.L.; Kristensen, A.T.; Koch, J. 2009. Haematological and biochemical changes in dogs naturally infected with *Angiostrongylus vasorum* before and after treatment. *Vet. J.* 180(1): 106-11.
- Williams, J.F.; Willingham, A.L.; Ockens, N.W.; Kapel, C.M.; Monrad, J. 1996. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. *J. Helminthol.* 70(3): 259-263.
- Yacob, H.T.; Ayele, T.; Fikru, R.; Basu, A.K. 2007. Gastrointestinal nematodes in dogs from Debre Zeit, Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 148(2): 144-8.
- Yamaguti, S. 1961. *Systema helminthum; the nematodes of vertebrates.* New York: Intercience.

## 12. ANEXOS

### Anexo I

#### **Lei 6.638, 08 de maio de 1979**

#### **Normas para Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais**

Art. 1º – Fica permitida, em todo o território nacional, a vivisseção de animais, nos termos desta lei.

Art. 2º – Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgãos competentes e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º – A vivisseção não está permitida:

I. sem o emprego de anestesia

II. em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competentes

III. sem supervisão de técnico especializado

IV. com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados

V. em estabelecimentos de ensino de 1º e 2º grau e em quaisquer locais frequentados por menores de idade

Art. 4º – O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgico, quando, durante ou após a vivisseção, receber cuidados especiais

§ 1º Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições.

§ 2º Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por ele queiram responsabilizar-se

Art. 5º – Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

I. às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto – lei 3,688 de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração

II. à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência

Art. 6º – O poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

I. órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos

II. as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios

III. órgão e autoridade competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso

Art. 7º – Esta lei entra em vigor a partir da data de sua publicação

Art. 8º – Revogam-se as disposições em contrário.

## Anexo II