UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MATHEUS DINIZ GONÇALVES COELHO

**Avaliação do uso de probióticos no controle a infecção
causada por Ancylostomidae em cães (*Canis
familiaris*) naturalmente infectados**

Lorena – SP
2010

MATHEUS DINIZ GONÇALVES COELHO

**Avaliação do uso de probióticos no controle a infecção
causada por Ancylostomidae em cães (*Canis
familiaris*) naturalmente infectados**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de concentração: Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Lorena – SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Assessoria de Documentação e Informação
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Coêlho, Matheus Diniz Gonçalves

Avaliação do uso de probióticos no controle a infecção causada por Ancylostomidae em cães (*Canis familiaris*) / Matheus Diniz Gonçalves Coêlho; orientador Ismael Maciel de Mancilha. - Lorena, 2010.
94p.: fig..

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Ancilostomíase. 2. Probióticos 3. *Canis familiaris* 4. *Lactobacillus*
I.Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de , Orient.

CDU -579.6

A professora Me. Francine Alves da Silva Coêlho, minha esposa, com amor e gratidão pelo apoio, auxílio e compreensão durante todo o período de elaboração deste trabalho;

A Eunice Diniz Coêlho, minha mãe, *in memoriam*, que tão nova partiu, mas que durante sua vida se dedicou a educar e ensinar a seus filhos princípios os quais sigo até hoje;

Ao professor Heitor Gonçalves Coêlho, meu pai, em quem me espelhei e a quem devo sinceros agradecimentos por ter chegado até aqui, pelos seus estímulos, amor e orações;

A Davi Diniz da Silva Coêlho e Lucas Ferreira Gonçalves Coêlho, meus queridos filhos e fontes de inspiração para seguir sempre em busca de meus objetivos.

A Thiago Diniz Gonçalves Coêlho, meu querido irmão, pelo incentivo e amizade;

A toda minha família e em especial a tia Marly Galvão, por ter sempre acreditado que um dia seria possível a conquista dessa importante realização em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, principalmente, por ter permitido que essa conquista fosse alcançada, por ter me dado força de vontade, paciência e sabedoria para finalizar este projeto;

Ao professor Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pelo constante incentivo, apoio e orientação;

A minha amada esposa Me. Francine Alves da Silva Coelho por ter me apoiado, incentivado e contribuído em diversas etapas da execução desse trabalho;

A Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

A Faculdade de Pindamonhangaba - FAPI, em especial ao diretor e professor Luís Otávio Palhari, principalmente pelo incentivo e por ter permitido a realização de experimentos nos laboratórios de Parasitologia e de Microbiologia desta instituição;

A UNITAU por colocar a disposição os laboratórios de Parasitologia e Imunologia para a realização de experimentos;

A médica Veterinária Mylene Garcez Yemini, diretora do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Taubaté, pelo apoio e aprovação para que o trabalho fosse realizado nessa instituição;

A todos os tratadores, estagiários, técnicos e médicos veterinários que compõem a equipe do CCZ, sem os quais não teria alcançado o êxito deste trabalho;

A técnica do laboratório de Microbiologia da FAPI, Me. Fátima Cristina Padovam e a estagiária Carolina Marinho Cruz pelo apoio e por terem me ajudado com dedicação nas etapas concernentes a manutenção das cepas de *Lactobacillus*;

Ao professor Dr. Guilherme Dias Patto e a professora Dra. Silvia Maria Rodrigues Querido Mateus pelo apoio e concordância para que os experimentos fossem

realizados no laboratório de Microbiologia da FAPI;

A professora Dra. Ana Júlia Urias dos Santos Araújo, que me incentivou a iniciar o curso de Doutorado na EEL- USP e que se dispôs a ajudar sempre que possível;

A professora Me. Sônia Cursino, pelo apoio e incentivo dados;

A bióloga Juliana dos Santos Guimarães, técnica do laboratório de Imunologia da UNITAU, pela colaboração na realização do método de ELISA e todo o apoio dado na interpretação dos resultados.

A toda equipe do laboratório de Parasitologia da UNITAU, em especial ao estagiário Daniel Jesus de Freitas pelo apoio, pré-disposição e ajuda prestada no decorrer dos experimentos;

Aos amigos do laboratório de probióticos da EEL – USP, Taís e Juan, pela força dada no início da “familiarização” com as cepas utilizadas no trabalho;

Ao amigo de Pós-graduação, Me. Gustavo Peão, pela força, estímulo e apoio dados no decorrer dos 4 anos de realização do Doutorado.

Ao Sr. André, funcionário da secretaria de Pós-graduação da EEL-USP por ter sempre se disponibilizado quando precisei de seu auxílio.

“Porque Eu, o Senhor, teu Deus, te tomo pela tua mão direita e te digo:
Não temas que eu te ajudo”

(Is. 41:13)

BIOGRAFIA

Matheus Diniz Gonçalves Coelho nasceu na cidade de Campina Grande – PB, em 03 de Janeiro de 1976 e atualmente reside na cidade de Taubaté – SP. Em 1994 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Federal da Paraíba, no decorrer do qual foi aluno de Iniciação científica no laboratório de Química de Produtos Naturais – LQPN, onde desenvolveu estudos de isolamento e caracterização de extratos de plantas da região. Posteriormente teve a oportunidade de estagiar no centro de Assistência Toxicológica da Paraíba (CEATOX). Em 1998 concluiu a graduação e cursou especialização em Análises Clínicas até o ano de 2000. Neste mesmo ano passou a residir na cidade de São Paulo - SP, onde estagiou no laboratório de Parasitologia do Instituto de Infectologia Dr. Emílio Ribas e no laboratório de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Em 2001 ingressou no programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde obteve título de Mestre em Farmácia, na área de Análises Clínicas. Em 2006 foi contratado como professor da disciplina de Parasitologia na Faculdade de Pindamonhangaba, onde atualmente ministra aulas de Epidemiologia e Higiene de Alimentos e desenvolve projetos na área de Epidemiologia das Doenças Parasitárias em populações humanas e animais.

No ano de 2006, ingressou no Programa de Pós graduação em Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, em nível de Doutorado voltado para avaliação de propriedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* e sua aplicação para o controle de doenças parasitárias.

Atualmente é membro da Sociedade Paulista de Parasitologia, e participa de grupos de pesquisa em Parasitologia Aplicada e Microbiologia Aplicada e Bioprocessos.

RESUMO

COELHO, M. D. G. **Avaliação do uso de probióticos no controle a infecção causada por Ancylostomidae em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados.** 2010. 94p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

O cão (*Canis familiaris*) é o animal doméstico que convive mais em proximidade com o homem, como animal de companhia e guarda. No entanto, existe uma série de parasitos zoonóticos de cães, que levam ao desenvolvimento de patologias muitas vezes de prognóstico grave para o ser humano. Dentre esses destacam-se os helmintos da família Ancylostomidae que são encontrados com frequência em inquéritos coproparasitológicos. A ancilostomíase canina é caracterizada pelo desenvolvimento de anemia, perda de peso e dores abdominais, sendo o tratamento com drogas anti-helmínticas alopáticas fundamental para eliminação do parasito. Porém, devido à ocorrência cada vez maior de resistência a tratamentos com medicamentos alopáticos e aos riscos inerentes ao uso abusivo destes medicamentos, a pesquisa de novos insumos terapêuticos consiste em uma promissora iniciativa, e, neste sentido os probióticos têm se destacado, por serem capazes de alterar positivamente a microbiota intestinal e exercer efeito imunomodulador, e, assim sendo, contribuir para o controle de agentes patogênicos. Com o intuito de contribuir para a compreensão do mecanismo de ação de espécies de microrganismos que apresentam atividade probiótica sobre helmintos, no presente trabalho objetivou-se avaliar o papel de espécies de *Lactobacillus* à saber: *L. acidophilus* ATCC 4536, *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. delbrueckii* UFV H2B20, na forma de um “pool”, no sentido de estimularem a resposta imune, bem como reduzir o quadro de anemia e a carga parasitária em cães naturalmente infectados com Ancylostomidae. Para tanto, selecionou-se 40 cães do CCZ de Taubaté-SP, divididos em 4 grupos: 10 animais naturalmente infectados com Ancylostomidae aos quais foi administrada a preparação probiótica, contendo 1×10^6 UFC de cada cepa de *Lactobacillus*; 10 animais naturalmente infectados que não foram submetidos a nenhum tratamento; 10 animais não infectados e não submetidos a nenhum tratamento e 10 animais não infectados aos quais foi administrada a preparação probiótica em estudo. Esta preparação foi administrada em dias alternados, por 28 dias e os animais foram acompanhados semanalmente para determinação do número de ovos por grama (OPG) de fezes, dosagem dos níveis de IgE sérica e avaliação do hemograma. Os resultados permitiram observar que o tratamento com a preparação probiótica se mostrou promissor no controle à ancilostomíase canina, sendo observada uma redução significativa ($p < 0,05$) de 88,83% da contagem de OPG nas fezes dos animais (GITP), sendo esta menor que a observada nos demais grupos. Observou-se também uma melhora na imunidade destes animais, observada pelo aumento de IgE e da contagem global de leucócitos. Desta forma, demonstrou-se o potencial das espécies de *Lactobacillus* no controle da ancilostomíase canina.

Palavras-chave: Probióticos, *Lactobacillus*, *Canis familiaris*, Ancilostomíase

ABSTRACT

COELHO, M. D. G. **Evaluation of the probiotic's microorganisms use in the control of hookworm infection in natural infected dogs (*Canis familiaris*)**. 2010. 94p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Dogs (*Canis familiaris*) are the domestic animals that live in more proximity to human, serving as guards as well as company but that are a range of canine diseases that leads to the development of serious prognostic pathologies to mankind. Therefore, some intestinal parasites should be emphasized, among them, the *Ancylostomidae* family, considering that they are frequently found in canine faecal samples. Canine ancylostomiasis has a wide array of general symptoms, eg, anemia, weight loss and abdominal pain, and the use of some alopathic antihelmintics is considered fundamental to eliminate these hookworm species. Nevertheless, taking into account the high resistance to such alopathic drugs and the inherent risk involved with their use, the development of new therapeutic strategies is a promising enterprise and probiotics seem to be a promising alternative, in view of its capacity of positively alter the intestinal microbiota and of exerting an immunomodulatory effect which can finally contribute to pathogen's control. Intending to contribute for the understanding of probiotics action against helminths, the present study has the aim of evaluating the antihelmintic properties of some *Lactobacillus* isolates, namely *L. acidophilus* ATCC 4536, *L. plantarum* ATCC 8014 and *L. delbrueckii* UFVH2B20, as a "pool", in the stimulation of immune response against, and in reducing the anemia and the parasite counts in hookworm naturally infected dogs. Forty dogs sheltered in the Centro de Controle de Zoonoses, Taubate, Brazil, were selected and split into four groups: Ten hookworm naturally infected dogs, treated with a pool of *Lactobacilli*, containing 1×10^6 of each one of the bacterial strains; Ten hookworm naturally infected animals, not treated with any drug; Ten non-infected animals which did not receive any treatment; and ten non-infected dogs which received a pool containing the three bacterial isolates. The pool was administered during 28 alternate days and animals were followed weekly in order to determine EPG (number of eggs per gram of feces), serum IgE levels and blood counts. It was observed that the administration of the probiotic pool is promising in the control of hookworm canine infection, and a statistically significant reduction (88.83%) of EPG in the treated animal group was demonstrated. It was also observed an increase in the immune response, as demonstrated by the higher levels of IgE and increased leukocyte count, which emphasizes the potential use of these *Lactobacilli* specimens in the canine ancylostomiasis control.

Keywords: Probiotics, *Lactobacillus*, *Canis familiaris*, Ancilostomiasis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem (Microscopia eletrônica) de <i>Ancylostoma caninum</i>	28
Figura 2. Cápsulas bucais de espécies da família Ancylostomidae que parasitam cães	29
Figura 3. Ciclo biológico de <i>A.caninum</i>	29
Figura 4. Efeitos benéficos resultantes do uso de probióticos	42
Figura 5. Câmara de Macmaster	50
Figura 6. Valores de OPG no grupo de animais naturalmente infectados e tratados com preparação probiótica (GTP)	55
Figura 7. Valores médios do número de hemácias no sangue periférico dos grupos de animais avaliados	58
Figura 8. Valores médios da concentração de hemoglobina no sangue periférico dos grupos de animais avaliados	60
Figura 9. Valores médios do número de leucócitos no sangue periférico dos grupos de animais avaliados	61
Figura 10. Valores médios do número de leucócitos no sangue periférico do grupo GTP, no decorrer do tratamento com a preparação probiótica	63
Figura 11. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GTP	63
Figura 12. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GINT	64
Figura 13. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GNIP	64
Figura 14. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GNINT	65
Figura 15. Valores médios do número de eosinófilos no sangue periférico dos grupos de animais avaliados	67
Figura 16. Valores médios da concentração de IgE no sangue periférico dos grupos de animais avaliados	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Quadro sinóptico de algumas zoonoses transmitidas pelo cão doméstico	24
Quadro 2. Frequência de ancilostomíase em populações de cães no Brasil	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
IgE	Imunoglobulina E
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
MBP-1 e MBP-2	Major Basic Protein ou Proteína Básica Principal
OPG (FERCT)	Ovos por grama de fezes (fecal egg reduction count tests)
UFC	Unidade formadora de colônia
TGI	Trato Gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O PAPEL DO CÃO DOMÉSTICO (<i>Canis familiaris</i>) NA TRANSMISSÃO DE ZOONOSES	23
2.2 A FAMÍLIA ANCYLOSTOMIDAE	26
2.2.1 <i>Ancylostoma</i> spp. EM CÃES	26
2.3 RESPOSTA IMUNE A HELMINTOS	32
2.3.1 RESPOSTA IMUNE NA ANCILOSTOMÍASE	34
2.4 TRATAMENTO DA ANCILOSTOMÍASE CANINA	35
2.4.1 TRATAMENTO ALOPÁTICO	36
2.4.2 VACINAÇÃO	37
2.4.3 TRATAMENTOS ALTERNATIVOS	39
2.4.4 PROBIÓTICOS	40
2.4.4.1 USO DOS PROBIÓTICOS NOS PROCESSOS INFECCIOSOS	42
2.4.4.2 PROBIÓTICOS E INFECÇÕES PARASITÁRIAS	44
3 METODOLOGIA	46
3.1 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	46
3.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS PARA EXPERIMENTAÇÃO	47
3.2.1 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE DOS ANIMAIS: INCLUSÃO E EXCLUSÃO	47
3.2.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS	47
3.2.3 SELEÇÃO DE ANIMAIS PARASITADOS	48
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.5 HEMOGRAMA E DOSAGEM DE IgE	50
3.6 ASPECTOS ÉTICOS	51
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 EFEITO DOS PROBIÓTICOS SOBRE ANCYLOSTOMIDAE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS	53
4.2 HEMOGRAMA	57
4.2.1 EFEITO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA SOBRE O ESTADO ANÊMICO DOS ANIMAIS	57

4.2.2 EFEITO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA SOBRE A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS	61
4.3 EFEITO DA PREPARAÇÃO PROBIÓTICA SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE IgE CIRCULANTE	68
5 CONCLUSÃO	71
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	87
APÊNDICES	91

1 INTRODUÇÃO

Os cães representam os animais domésticos que convivem com mais frequência com os humanos podendo trazer vários benefícios psicológicos, emocionais e físicos, porém o convívio com estes animais pode acarretar um maior risco de exposição a doenças zoonóticas.

Diversos parasitos que possuem o cão como hospedeiro natural podem causar danos ao ser humano, sendo os helmintos da família Ancylostomidae apontados como os mais prevalentes entre estes animais, conforme demonstrado em diversos inquéritos parasitológicos no Brasil e no mundo (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Estes parasitos podem causar distúrbios intestinais nos cães, levando a manifestação de sintomas como anemia, perda de peso e dores abdominais, podendo inclusive levar ao óbito, e são capazes de desencadear processos patológicos no ser humano, dentre os quais: a Síndrome da Larva Migrans Cutânea (SLMC) e a Enterite Eosinofílica.

Uma das medidas profiláticas mais importantes para que o ser humano não se infecte é a adoção de tratamento antiparasitário nos animais, que são os hospedeiros naturais destes parasitos. No entanto, apesar da grande disponibilidade de medicamentos alopáticos para este fim, há uma clara dificuldade em se controlar a ancilostomíase canina.

Tal problemática pode ser atribuída principalmente aos hábitos higiênicos e alimentares destes animais e pela contaminação do meio ambiente por fezes, provocada principalmente pela existência de grandes quantidades de cães errantes, que raramente são tratados e acabam difundindo ovos e larvas deste helminto. Além disso, o tratamento com os medicamentos anti-helmínticos disponíveis no mercado requer a administração de diversas doses e uma série de repetições ao longo da vida do animal, fazendo com que o tratamento seja negligenciado ou abandonado, ou acarretando o desenvolvimento de resistência.

Assim sendo, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para o controle a esta parasitose, destacando-se o potencial uso de probióticos para este fim. Os probióticos são produtos constituídos de microrganismos vivos e não patogênicos que podem promover um balanceamento favorável da microbiota

do Trato Gastro Intestinal (TGI), bem como uma modulação positiva da resposta imune, contribuindo desse modo na prevenção e tratamento de patologias.

Dentre os microrganismos que apresentam propriedades probióticas destacam-se espécies de *Lactobacillus* que apresentam capacidade de tolerar níveis de pH ácido e, assim sendo, sobreviver a passagem pelo TGI. Por apresentarem estas características, estes microrganismos também apresentam o potencial de inibir ou dificultar a colonização de espécies patogênicas em nível do sistema digestório, podendo então ser avaliados como ferramenta potencial para o controle de diversos processos infecciosos, inclusive da ancilostomíase canina.

Desta forma, no presente trabalho objetivou-se contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação de espécies de microrganismos que apresentam propriedades probióticas sobre helmintos, particularmente espécies da família Ancylostomidae (Looss, 1905). Para tanto, especificamente avaliou-se o papel de espécies de *Lactobacillus*, na forma de “pool”, na estimulação da resposta imune, bem como na capacidade de reduzir o quadro de anemia e a carga parasitária de cães naturalmente infectados.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - O papel do cão doméstico (*Canis familiaris*) na transmissão de zoonoses

Os animais de estimação, especialmente o cão doméstico, representam significantes benefícios para as pessoas e para a sociedade, já que podem contribuir para o desenvolvimento físico, social e emocional das crianças, e para o bem estar de seus proprietários; no entanto, apesar destes benefícios, a proximidade estabelecida com este animal pode favorecer uma maior exposição a agentes com elevado potencial zoonótico (LABRUNA et al., 2006; SILVA et al. 2007).

Os humanos podem ser infectados por um total de 1407 espécies de patógenos, entre vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, sendo que 816 (58%) deste total de patógenos são considerados zoonóticos (WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005), e, neste sentido, o cão doméstico ocupa um lugar de destaque, pelo fato de ser o animal que mais frequentemente convive com o ser humano, e também pelo fato de que esta espécie está envolvida involuntariamente com a transmissão de mais de 60 infecções zoonóticas, constituindo uma importante fonte de infecção por helmintos, protozoários, bactérias, fungos e vírus (quadro 1) (BAXTER; LECK, 2010; FERREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2007).

Quadro 1. Quadro sinóptico de algumas zoonoses transmitidas pelo cão doméstico

Espécie	Classificação	Transmissão	Habitat e Sintomatologia no Cão	Habitat e Sintomatologia no Homem	Fonte
<i>Cryptosporidium parvum</i> (Tizzer, 1907)	Protozoário	Ingestão de oocistos	Intestino delgado Diarréia, perda de peso	Intestino delgado/ Diarréia, anorexia	Lallo; Bondan (2006)
<i>Giardia dulodenalis</i> (Kunstler, 1882)	Protozoário	Ingestão de cistos	Intestino delgado Diarréia, perda de peso	Intestino delgado/ Diarréia, anorexia	Santos; Castro (2006)
<i>Ancylostoma caninum</i> (Ercolani, 1859)	Nematoda	Penetração de larvas filarióides (L3)	Intestino delgado, anemia, diarréia, anorexia	estrato cutâneo/ Lesões serpinginosas	Oliveira et al. (2009); Araújo et al. (2000)
<i>Dipylidium caninum</i> (Linnaeus, 1758)	Cestoda	Ingestão de pulgas parasitadas	Intestino delgado/ perda de peso, fraqueza, falta de apetite	Intestino delgado/ Dor abdominal, diarréia, prurido anal	Molina; Ogburn; Adegboyega (2003)
<i>Dirofilaria immitis</i> (Leidy, 1856)	Nematoda	Picada de mosquito Culicidae	Sistema circulatório (coração direito e artérias)/ tosse, fraqueza, falta de ar	Pulmões/ nódulos pulmonares	Abiel; Lourenço-de-Oliveira; Saraiva (1999); Morchan et al. (2010)
<i>Toxocara canis</i> (Werner, 1782)	Nematoda	Ingestão de ovos infectantes	Intestino delgado/ diarréia, flatulência, desidratação	Lesões oculares, problemas neurológicos, hepatomegalia	Liao et al. (2010)
<i>Trichuris vulpis</i> (Froelich, 1789)	Nematoda	Ingestão de ovos infectantes	Intestino grosso/ Perda de peso, anorexia, anemia	Intestino grosso: perda de peso, anorexia, anemia	Capuano; Rocha (2006)
<i>Sarcoptes scabiei</i> (De geer, 1778)	Acaridae	Contato	Estrato cutâneo/ lesões tegumentares, prurido intenso	Estrato cutâneo/ lesões cutâneas, prurido intenso	Walton (1999)
Rotavírus	Vírus	Contato direto/ ingestão de alimentos contaminados	Sistema digestório/ Diarréia, vômito, febre alta	Sistema digestório/ Diarréia, vômito, febre alta	Ruiz et al. (2009)
Lyssavirus	Vírus	Mordedura de cães e morcegos	Sistema nervoso central/ inquietação, agressividade, paralisia, coma	Sistema nervoso central/ convulsões, descordenação, paralisia	Batista et al. (2008)
<i>Microsporium canis</i> (Sabouraud, 1894)	Fungo	Contato com fômites contaminados, cães e pêlo de cão infectado	Estrato cutâneo/ lesões tegumentares, prurido intenso	Lesões na pele, lesões no couro cabeludo com comprometimento de pêlos	Gürtler; Diniz, Nicchio (2005)
<i>Pasteurella multocida</i> (Lehmann; Neumann, 1899)	Bactéria aeróbia Gram negativa	Mordedura de cães e gatos	Sistema circulatório e digestório/ diarréia e septicemia	Sistema respiratório/ abscessos pulmonares	Arashima; Kumasaka (2005)
<i>Campylobacter</i> spp. (Sebald; Véron, 1963)	Bactéria Gram negativa	Ingestão de alimento contaminado	Sistema digestório/ gastroenterite, abortamento fetal diarréia, septicemia	Sistema digestório/ gastroenterite, abortamento fetal diarréia, septicemia	Pizzolitto; Pizzolitto (2000)
<i>Salmonella</i> spp. (Salmon; Smith, 1885)	Bactéria Gram negativa	Ingestão de alimento contaminado	Sistema digestório/ Febres entéricas	Sistema digestório/ Febres entéricas	Jofe; Schlesinger (2002)

Estima-se que a população de cães é de 500 milhões, estando dispersos em todos os continentes (MACPHERSON et al, 2005). No decorrer de sua longa história de domesticação, os cães têm se estabelecido como fontes de zoonoses e têm servido como pontes para a migração de patógenos entre animais de criação, animais selvagens e humanos (SALB et al. 2008).

Vários pesquisadores têm ressaltado o papel do cão como um importante disseminador de zoonoses, sendo que o risco de transmissão para o ser humano não se limita apenas ao ambiente doméstico, haja vista o fato de que muitas vezes estes animais são levados pelos seus donos para passearem em áreas públicas, que são comumente freqüentadas pela população, e defecam nestes locais (UGBOMOIOKO; ARIZA; HEUKELBACK, 2008; SALB et al, 2008; CAPUANO; ROCHA, 2006).

Os cães errantes, por sua vez, também desempenham um importante papel na manutenção desses patógenos no ambiente, uma vez que podem circular livremente em áreas públicas e raramente são submetidos a algum tipo de tratamento profilático, nem recebem os mesmos cuidados que são dispensados aos cães domiciliados (CAPUANO; ROCHA, 2006; SANTOS et al. 2007).

Segundo Santos et al. (2007), os cães jovens e com diarreia são os principais disseminadores de doenças zoonóticas, uma vez que podem oferecer risco tanto para o meio ambiente quanto para as pessoas que convivem mais próximos destes animais.

Os cães também são reconhecidos como fontes de doenças parasitárias emergentes e reemergentes em humanos, dentre as quais, a Enterite Eosinofílica que é causada pelo *Ancylostoma caninum* e a Hidatidose Alveolar, causada pelo *Echinococcus multilocularis* (Leukart, 1863), sendo ainda considerados importantes fontes de parasitos para indivíduos imunocomprometidos (SALB et al., 2008).

As parasitoses intestinais consistem nas doenças mais rotineiramente diagnosticadas em cães, apesar das medidas terapêuticas e profiláticas disponíveis, e, deste modo, ovos e larvas de helmintos, bem como oocistos e cistos de protozoários entéricos são eliminados nas fezes destes animais, propiciando a contaminação ambiental e a conseqüente transmissão de parasitos para outros hospedeiros (ANDRESIUK et al, 2003).

Essas zoonoses parasitárias, embora não sejam causas freqüentes de óbitos em humanos, podem provocar alergias, diarreias, anemias, despesas com diagnóstico, tratamento e perdas econômicas, que podem resultar em redução da produtividade (VASCONCELLOS; BARROS; OLIVEIRA, 2006).

2.2 - A família Ancylostomidae

Os ancilostomídeos pertencem ao reino Animalia, filo Nematelminthes, sub-filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Strongylida, família Ancylostomidae.

A família Ancylostomidae é composta por 18 gêneros cujas espécies parasitam uma vasta quantidade de hospedeiros mamíferos, aos quais podem causar infecções em nível intestinal, se alimentando de mucosa e sangue e levando a manifestação de sintomas como anemia, perda de peso e dores abdominais, podendo inclusive levar ao óbito (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Algumas dessas espécies, uma vez sendo transmitidas a hospedeiros não habituais, são incapazes de completar o ciclo vital, causando um distúrbio conhecido como Síndrome da Larva *Migrans* Cutânea (SLMC), que, como o próprio nome indica, é caracterizada pela migração de formas imaturas do parasito no estrato cutâneo, sendo esta síndrome caracterizada pelo desenvolvimento de lesões pruriginosas, hemorragias, petéquias e edema inflamatório (MORO et al. 2008).

A ingestão de larvas de *A. caninum* também pode levar a presença de formas adultas de *Ancylostoma caninum* no intestino humano, que foi identificada como sendo causa de Enterite Eosinofílica, doença caracterizada por dor e distensão abdominal, diarreia, perda de peso e hemorragia retal (ROBERTSON; THOMPSON, 2002; LANDMANN; PROCIV, 2003).

2.2.1 - Ancylostomidae em cães

As espécies da família Ancylostomidae são os helmintos que mais frequentemente parasitam o cão doméstico, conforme observado em diversos levantamentos realizados no Mundo e em diversos estados do Brasil, sendo

amplamente diagnosticadas nas mais diversas populações de cães. Por outro lado, são inúmeras as pesquisas nas quais se tem enfatizado a contaminação ambiental de áreas públicas e de áreas de recreação infantil, condição esta que favorece um aumento de risco para a Saúde pública (quadro 2).

Quadro 2. Ocorrência de Ancylostomidae em estudos ambientais e em populações de cães no Brasil e no mundo

Local do estudo	Composição amostral	Total de Amostras avaliadas	Total de Amostras positivas	Ancylostomidae entre o total de amostras	Fonte
Praia Grande – SP	Fezes coletadas em canteiros de praias	257	121	118 (47,1%)	Castro; Santos; Monteiro (2005)
Ribeirão Preto – SP	Fezes coletadas em praças públicas	331	138	49 (14,8%)	Capuano; Rocha (2006)
São Paulo – SP	Cães atendidos em hospital-escola	1755	486	223 (12,7%)	Funada et al. (2007)
Rio de Janeiro – RJ	Cães institucionalizados	204	93	71 (34,8%)	Vasconcellos; Barros; Oliveira (2006)
Campos dos Goytacazes – RJ	Cães domiciliados	68	30	30 (44,11%)	Miranda et al. (2008)
Itapema – SC	Fezes coletadas em areia da praia	150	20	17 (11,33%)	Leite et al. (2006)
Goiânia – GO	Cães errantes	201	97	91 (45,27%)	Oliveira et al. (2009)
Viçosa – MG	Cães atendidos em hospital veterinário	734	256	136 (18,52%)	Araújo (2006)
Santa Maria – RS	Cães domiciliados	240	211	167 (69,58%)	Silva et al. (2007)
Porto Alegre – RS	Clínicas veterinárias	1473	392	136 (9,23%)	Lorenzini; Tasca; De Carli (2007)
Austrália	Cães domiciliados	1391	-	96 (6,9%)	Palmer et al. (2007)
Grécia	Cães domiciliados	952	-	99 (10,42%)	Menelaos; Smaragda (2006)
França, Bélgica, Alemanha, Itália e Espanha	Cães domiciliados	235	14	14 (6%)	Grandemange et al. (2007).

Dentre as diversas espécies da família Ancylostomidae existentes, três delas têm o cão como hospedeiro natural, sendo duas componentes do gênero *Ancylostoma* (Dubini, 1843), à saber, *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) (figura 1) e *A. braziliense* (de Faria, 1910), e uma pertencente ao gênero

Uncinaria, que é a espécie *Uncinaria stenocephala* (Railliet, 1884).

Figura 1. *A. caninum* (Imagem obtida por Microscopia eletrônica). Os parasitos do gênero *Ancylostoma* apresentam pares de dentes na margem ventral da cápsula bucal. A extremidade posterior do macho é equipada com uma bolsa copulatória típica, com função de captura e fixação à fêmea durante o processo de reprodução.

Fonte: www.denniskunkel.com

As características morfológicas destas espécies são bastante aproximadas, entretanto existem alguns fatores que diferem marcadamente e que auxiliam na diferenciação do verme adulto, principalmente aqueles que dizem respeito à presença e quantidade de dentes (*A. caninum* – 3 pares de dentes e *A. braziliense* – 1 par de dentes) ou placas quitinosas cortantes na cápsula bucal (*Uncinaria stenocephala*), (figura 2), bem como o formato da bolsa copuladora do macho. Existem também fatores biológicos que são diferentes entre estas espécies, dentre os quais a oviposição diária e a quantidade média de sangue ingerido (*Uncinaria* remove quantidades insignificantes de sangue, ao passo que *A. caninum* remove cerca de 0,1 ml por espécime) (SILVA, 2010).

Figura 2. cápsulas bucais de espécies da família Ancylostomidae que parasitam cães: a- *Uncinaria stenocephala* – com placas cortantes; b- *Ancylostoma braziliense* – com um par de dentes largos e c- *Ancylostoma caninum* – com 3 pares de dentes.

(fontes: a, b- <http://cal.vet.upenn.edu/projects> ; c- www.ksu.edu/parasitology)

tem o cão como hospedeiro natural são bastante semelhantes entre si, no entanto o ciclo vital do *A. caninum* é considerado o mais complexo, por envolver múltiplos mecanismos de transmissão e migração das larvas no hospedeiro, que podem não ocorrer nas outras espécies, sendo *A. caninum* a espécie mais frequente no Brasil e em outras regiões do mundo (MUSSI; MATTOS JUNIOR; BALTHAZAR, 2008; LOUKAS; PROCIV, 2001).

A. caninum é um parasito geohelminto com ciclo biológico do tipo monoxênico, medindo aproximadamente 1,5cm de comprimento, possuidor de um grande aparelho bucal, com três pares de dentes que se fixam à mucosa do intestino do cão (LOUKAS; PROCIV, 2001). Este parasito possui um ciclo de vida com duas etapas, sendo uma livre no solo e outra obrigatoriamente parasitária (figura 3).

Figura 3. Ciclo biológico de *Ancylostoma caninum* – adaptado (Fonte: <http://cal.vet.upenn.edu>)

A fêmea adulta do *Ancylostoma caninum* pode produzir de 7000 a 28000 ovos diariamente. Para o seu desenvolvimento os ovos necessitam da presença de oxigênio quando a temperatura e umidade estão favoráveis. A temperatura ideal para o desenvolvimento do *A. caninum* varia entre 23°C e 30°C, sendo que se ela estiver abaixo de 23°C, o crescimento torna-se lento, podendo aparecer larvas infectantes 22 dias após a produção ou também as larvas podem acabar morrendo caso a temperatura ultrapasse os 37°C, o que acontece na maioria dos casos (MORAES et al., 2004).

Uma vez estando infectado e ao defecar no solo, o cão pode liberar milhões de ovos, que em condições ambientais favoráveis (umidade em torno de 70% e temperatura de 27° C), podem eclodir, liberando larvas L1 rabditóides, que passam a migrar ativamente no solo e evoluem para larvas L2 filarióides. As larvas L2 não perdem a cutícula externa ao originarem a larva de terceiro estágio (L3 filarióide); deste modo, as larvas L3 ficam envoltas pela cutícula das larvas L2, o que as torna incapazes de se alimentar. A larva L3 é a forma infectante, que pode ser ingerida ou penetrar na pele desprotegida (MORO et al., 2008).

Se ingerida, a larva L3 pode passar através do estômago, resistindo a acidez gástrica, e evoluir a verme adulto no intestino delgado do hospedeiro; por outro lado, uma vez penetrando na pele de um cão, estas larvas migram através do sistema circulatório, chegando aos pulmões (ciclo de Loss) e migrando até a traquéia, a partir da qual podem ser ingeridas, alcançando o intestino delgado, chegando a larva L4, e, finalmente, atingindo o estágio adulto (MORO et al., 2008). Alternativamente as larvas L3 podem migrar a partir do pulmão, e, se dispersar através dos tecidos (migração somática) se depositando nos músculos esqueléticos e entrando em um estágio de dormência (larvas L3 hipobióticas) (LOUKAS; PROCIV, 2001).

As larvas L3 hipobióticas são capazes de reativar e migrar para o intestino onde se tornam vermes adultos, e este fenômeno ocorre principalmente no verão, quando o clima se torna quente e chuvoso, e, portanto, mais propício para transmissão. As larvas hipobióticas também podem ser reativadas em situações de baixa imunidade e durante a administração de drogas anti-helmínticas, promovendo, desse modo, a recolonização periódica do intestino (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007; MORAES et al., 2004).

As mudanças hormonais na época do parto também funcionam como sinalizadoras para as larvas hipobióticas, já que larvas L3 encistadas nos músculos esqueléticos de cadelas prenhes são reativadas durante este período, e podem ser eliminadas no leite durante um período de aproximadamente 3 semanas após o parto, assegurando a infecção de matilhas inteiras de filhotes, sendo este um fator de grande importância na epidemiologia e na letalidade da ancilostomíase canina (MORAES et al., 2004).

No intestino, os vermes adultos sugam uma parte das vilosidades intestinais através da sua cápsula bucal, prendendo-a com seus dentes, e a partir daí, as glândulas anteriores passam a secretar proteases e peptídeos anticoagulantes na cavidade bucal e esôfago do parasito, para assim pré-digerir o tecido de mucosa do hospedeiro. O parasito muda seu local de ancoragem a cada 4 a 6 horas, provavelmente em resposta ao dano provocado no tecido ou também devido à resposta inflamatória local (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Os sintomas que podem ser observados em um hospedeiro canino parasitado são diarreia, caquexia e anemia, com perda média de sangue variando de 0,01 a 0,2ml por espécime de *Ancylostoma caninum*, e, dependendo da severidade da doença induzir a uma debilidade no organismo, propiciando ao aparecimento de outras enfermidades, ou, em casos mais severos, levar o hospedeiro à morte (MORAES et al., 2004).

Estes parasitos também podem favorecer a multiplicação e penetração de bactérias patogênicas, uma vez que as lesões determinadas na mucosa intestinal, associadas às perdas de tecido e de sangue, podem servir como porta de entrada a estes microrganismos, desencadeando um quadro de enterite hemorrágica (MUSSI; MATTOS; BALTHAZAR, 2008).

A ancilostomíase canina ainda pode acarretar diversos problemas relacionados com a infecção, sendo a mais comum a pneumonia. As formas clínicas da Ancilostomíase em cães são distinguidas em: Ancilostomíase hiperaguda, Ancilostomíase aguda, Ancilostomíase crônica e Ancilostomíase secundária.

Bowman et al (1991) descreve as formas clínicas:

A- ancilostomíase hiperaguda: ocorre em filhotes de fêmeas no período de lactação, para os quais a transmissão ocorre através do leite, sendo caracterizada

pela diminuição do bem-estar do animal. O diagnóstico deve ser feito através dos sinais clínicos que são evidentes devido às mucosas se apresentarem pálidas e as fezes estarem amolecidas ou líquidas, já que o parasito não produz ovos até o 16º dia de infecção;

B- Ancilostomíase aguda: se dá quando filhotes de cães mais idosos se infectam com altas quantidades de larvas infectantes, levando a quadros clínicos graves e até a morte;

C- Ancilostomíase crônica: Geralmente é assintomática, sendo diagnosticada pela grande quantidade de ovos nas fezes do animal e pela redução do número de hemácias, hemoglobina ou hematócrito;

D- Ancilostomíase secundária: Frequentemente ocorre em cães idosos, os quais se encontram debilitados em decorrência de doenças e problemas de saúde já existentes. O principal sinal clínico é a ocorrência de anemia profunda podendo também levar o animal a morte.

2.3 - Resposta imune a helmintos

De acordo com Machado et al. (2004), os mecanismos envolvidos na resposta imune a helmintos são bastante amplos, em parte devido ao tamanho e a diversidade metabólica dos parasitos, que trazem como consequência uma razoável complexidade antigênica.

O sistema imunológico atua por duas vias padrões de resposta imune adquirida, sendo uma mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares do tipo 1 (Th1), que ocorre nas infecções virais e bacterianas, bem como nas doenças auto-imunes, e outra mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares 2 (Th2), que são ativados nas reações a infecções helmínticas e nas doenças alérgicas, como asma e rinite (WAN; FLAVEL, 2009; PONTE; RIZZO; CRUZ, 2007).

No ciclo de vida natural de muitos helmintos ocorrem migrações através de extensas superfícies de tecido, dentre os quais a pele, os pulmões e o intestino. A passagem pelos tecidos, pelas formas larvárias, e a permanência dos vermes adultos em seu habitat definitivo, são facilitadas pela secreção de diversas proteases por parte do helminto, que permitem a digestão de proteínas estruturais dos tecidos do hospedeiro, tais como: fibronectina, colágeno e laminina. As

proteases dos parasitos, por sua vez, induzem uma intensa resposta imune com produção de citocinas da resposta imune Th2 (IL-4 e IL-5, dentre outras) (PERRIGOUE; MARSHALL; ARTIS, 2008).

A IL-4 tem a capacidade de induzir produção de imunoglobulina E (IgE); Já a IL-5 ativa os eosinófilos, basófilos e mastócitos; sendo assim, a eosinofilia, a mastofilia e a basofilia, bem como o aumento de IgE em nível sérico, são características da resposta imune a helmintos (PONTE; RIZZO; CRUZ, 2007).

Na resposta imune do tipo Th-2, a imunidade humoral, que se efetiva a partir da indução de linfócitos B, também exerce um papel de grande importância, já que estes linfócitos são induzidos a direcionar a produção de IgE, um anticorpo mediador primário que induz a degranulação de basófilos e mastócitos, com aumento da permeabilidade vascular, contratividade de musculatura lisa e recrutamento de células efectoras da resposta imune do tipo Th2, incluindo os eosinófilos (ANTHONY et al., 2007).

Os anticorpos da classe IgE ligam-se a basófilos circulantes ou a mastócitos teciduais, e induzem a liberação de histamina e outros mediadores, secreção de muco e aumento da contratilidade da musculatura intestinal, o que facilita a expulsão de vermes adultos (MACHADO et al, 2004; ARTIS, 2006).

Os mastócitos possuem receptores para IgE e quando determinado antígeno se liga a esta imunoglobulina na superfície do mastócito, esta célula é ativada e libera os seus grânulos, com liberação de histamina, que aumenta a circulação sanguínea e a permeabilidade do sítio onde há o processo infeccioso, havendo então um maior recrutamento de novos eosinófilos (ARTIS, 2006).

Os eosinófilos são células sanguíneas que podem ser recrutadas para locais onde ocorrem infecções helmínticas, especialmente nas mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário. Estas células são recrutadas através de fatores liberados pelos mastócitos, que por sua vez, também induzem a concentração de eosinófilos próximos ao parasito, potencializando sua ação anti-parasitária (PERRIGOUE et al., 2008).

Este recrutamento de eosinófilos também se dá por parte de outras citocinas produzidas pelas células Th2, que promovem a ativação e recrutamento para os sítios inflamatórios. Uma vez no sítio inflamatório os eosinófilos se ligam a parasitos cobertos com IgE ou IgA e promovem a liberação de grânulos

citoplasmáticos tóxicos, havendo liberação de peroxidases, hidrolase lisossomal e lisofosfolipídeos, que degradam a parede celular dos helmintos (ZUO; ROTHENBERG, 2007).

Os grânulos dos eosinófilos contém um núcleo cristalóide composto pela proteína básica principal (major basic protein – MBP-1 e MBP-2) e uma matriz composta pela proteína catiônica do eosinófilo (ECP), pela neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e pela peroxidase do eosinófilo (EPO). Todas estas proteínas podem causar danos diretos e indiretos ao parasito, dentre os quais a formação de poros na membrana da célula-alvo, aumento da reatividade da musculatura lisa, aumento da degranulação de mastócitos e basófilos, e um aumento da geração de citocinas e mediadores lipídicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄), que aumentam a permeabilidade vascular, a secreção de muco e são potentes indutores da contração da musculatura lisa (ZUO; ROTHENBERG, 2007).

2.3.1 - Resposta imune na Ancilostomíase

De acordo com Loukas e Prociv (2001), apesar da importância da Ancilostomíase para a Saúde Pública, existe pouco conhecimento de importância prática sobre os detalhes de como os parasitos da família Ancylostomidae interagem com seus hospedeiros, incluindo os que dizem respeito à natureza e efetividade da resposta imune conseqüente da interação parasito-hospedeiro.

A maioria das informações disponíveis a este respeito está relacionada a observações clínicas e laboratoriais em humanos e à reprodução da infecção em modelos experimentais, dentre eles os roedores, porém, os ancilostomídeos humanos e de cães não evoluem à maturidade em animais de laboratório, uma vez que estes rapidamente se tornam resistentes a doses elevadas de larvas L3, sendo que esta resistência pode ser atribuída ao aumento da resposta imune humoral, com elevação de IgM, IgG1 e IgE (HOTEZ et al. 1999).

Conforme mencionado anteriormente, os helmintos, inclusive os da família Ancylostomidae, desencadeiam predominantemente uma resposta imune do tipo Th2 com produção elevada de IgE e eosinofilia. Além disso, os parasitos adultos induzem elevação de IgG e IgM, porém com baixas quantidades de IgA secretória, uma vez que esse helminto produz proteases que clivam IgA

especificamente (PRITCHARD, 1995).

Em humanos, a partir de estudos imunoepidemiológicos realizados com indivíduos com ancilostomíase em Papua Nova Guiné, observou-se uma carga parasitária menor, com menos parasitos férteis, nos pacientes que apresentavam níveis elevados de IgE, levando os autores a atribuir a este anticorpo um papel protetor polivalente, no entanto estas imunoglobulinas produzidas seriam totais e não específicas ao parasito (PRITCHARD; QUINNELL; WALSH, 1995).

Segundo BROOKER, BETHONY, HOTEZ (2004) a degranulação dos mastócitos em resposta aos níveis elevados de IgE tem uma grande importância na mobilização local e ativação dos eosinófilos. O papel dos mastócitos na ancilostomíase humana também pode ser destacado no que diz respeito à produção de proteases, que degradam colágeno da cutícula de *Necator americanus* adultos.

Os eosinófilos são predominantes na resposta inflamatória contra as larvas L3 nos tecidos, e com uma quantidade de larvas suficiente, podem também se encontrar aumentados em nível de sangue periférico de indivíduos infectados, podendo se apresentar funcionais e secretar superóxido, no entanto, a contribuição dos eosinófilos para destruição de helmintos não é totalmente comprovada (BROOKER, BETHONY, HOTEZ; 2004)

2.4 - Tratamento da Ancilostomíase canina

O cão parasitado por Ancylostomidae pode se apresentar assintomático ou, em contrapartida, apresentar sintomas graves podendo inclusive evoluir a óbito, conseqüente, por exemplo, de anemia severa, podendo estes animais se apresentarem parasitados em qualquer idade, e, por conta disso, o Centro de prevenção e controle de doenças dos Estados Unidos (CDC – Center for Disease Control and Prevention) recomenda que filhotes de cão sejam tratados para ancilostomíase inicialmente após 4, 6 e 8 semanas do nascimento. Além disso, recomenda-se a realização de esquemas de tratamento e diagnóstico regular de adultos, haja vista o fato de que infecções repetidas podem ocorrer durante a vida do animal adulto (STULL et al., 2007).

2.4.1 - Tratamento alopático

Segundo Crespilho et al. (2007), o tratamento de escolha para ancilostomíase canina corresponde ao pamoato de pirantel, droga pertencente ao grupo das tetraidropirimidinas, que provoca a imobilização do parasito por paralisia espástica, com conseqüente expulsão deste. Esta droga apresenta baixa toxicidade e é bem tolerada por filhotes, no entanto tem-se demonstrado o desenvolvimento de resistência a esta droga, devida provavelmente a existência de cepas que expressam uma menor quantidade de receptores sensíveis ao pirantel (KOPP et al., 2008).

Outras drogas como ivermectina, fembendazol e disofenol também apresentam atividade anti-helmíntica e também são utilizadas para este fim.

Fembendazol é uma droga do grupo dos benzimidazóis e produz efeito anti-parasitário por interferir na captação de nutrientes pelo helminto, já que altera a atividade da enzima fumarato-redutase, responsável pela síntese de ATP (adenosina trifosfato), provocando a morte do parasito por falta de energia. Além disso o fembendazol bloqueia a entrada de glicose nas células, obrigando os helmintos a consumirem suas reservas de glicogênio, culminando com a morte por carência energética (PRATS et al., 2005).

Os benzimidazóis também atuam ligando-se a sub-unidade da β -tubulina, impedindo assim a sua polimerização nos microtúbulos, que são unidades essenciais de organelas essenciais para diversos processos celulares, dentre os quais: mitose, metabolismo energético e codificação de proteínas (KÖHLER, 2001).

Disofenol é um produto sintético pertencente ao grupo dos Nitrofenóis, cujo modo de ação se baseia no bloqueio da respiração do helminto e consequente esgotamento das reservas energéticas, já que age interferindo na fosforilação oxidativa do helminto, através da inibição do sistema envolvido com a enzima fumarato-redutase. O uso desse medicamento pode causar taquicardia, lesões renais e hipertermia, que pode ser letal, particularmente após elevação da temperatura ambiental e após exercícios físicos (SOARES et al., 2001).

A ivermectina é uma lactona macrocíclica derivada da avermectina B, sendo produzida pela fermentação do *Streptomyces avermetilis*. A ação das

avermectinas se dá pela potencialização dos efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA), dificultando desse modo a transmissão dos estímulos nervosos para os músculos, e, conseqüentemente, impedindo a contração da célula muscular. Esta droga não ultrapassa a barreira hemato-encefálica na maioria dos mamíferos, mas apesar disso, o seu uso é contra-indicado em cães filhotes e em cães de diversas raças (DELAYTE et al., 2006; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996).

A ivermectina tem sido usada corriqueiramente na rotina dos tratamentos anti-helmínticos veterinários, já que também tem sua eficácia comprovada para uso em ectoparasitoses, como a sarna sarcóptica, no entanto com manifestação de efeitos tóxicos graves em diversos casos, tais como: deficiência visual total ou parcial, devido ao desenvolvimento de lesões histopatológicas de retina; hipoplasia linfóide, comprometimento reprodutivo nos machos, devido a azoospermia e oligospermia e comprometimento hepático, devido ao desenvolvimento de megalocitose hepática (PIMPÃO et al., 2005).

O desenvolvimento de resistência às drogas antihelmínticas por parte de *Ancylostoma* spp. e de outros helmintos, está relacionado à necessidade de tratamentos repetitivos com os anti-helmínticos atualmente disponíveis, a elevada re-infecção observada em cães, bem como à eficiência variável de tratamentos periódicos em áreas de risco, o que tem estimulado a procura de novas terapias que possam levar ao desenvolvimento de tratamentos profiláticos, e prover uma ferramenta adicional ao controle das infecções parasitárias (FUJIWARA et al., 2007).

2.4.2 – Vacinação

A produção de vacinas contra nematóides tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, no entanto a única vacina comercialmente disponível consiste em uma preparação de larvas L3 de *Diclyocaulus viviparus* atenuadas por irradiação, que é capaz de proteger bovinos contra um quadro de bronquite causada por este parasito (DEVANEY, 2005).

A atenuação de larvas por irradiação também foi utilizada para desenvolvimento comercial de vacina contra ancilostomíase em cães, sendo esta vacina produzida pela irradiação de larvas filarióides (L3) de *Ancylostoma*

caninum, trazendo a evidência de que através de vacinação pode-se induzir imunidade protetora contra este nematóide (MILLER, 1978).

Os ancilostomídeos produzem uma diversidade de moléculas, principalmente proteínas anticoagulantes e hemoglobinas, que são essenciais para a hematofagia e digestão de sangue, e que podem servir como alvos importantes para o desenvolvimento de vacinas (DEVANEY, 2005).

Muitas proteases produzidas pelos ancilostomídeos são liberadas na mucosa intestinal do parasito e participam de reações enzimáticas em cascata, para digerir hemoglobina e outras proteínas séricas do hospedeiro. Estas proteases têm sido foco de interesse para o desenvolvimento de vacinas, partindo do pressuposto que anticorpos produzidos contra tais moléculas seriam capazes de neutralizar sua ação, e, conseqüentemente levar a morte do parasito por inanição (DEVANEY, 2005; WILLIAMSON et al., 2004).

Hemoglobinas produzidas pelos vermes adultos têm sido alvo de tentativas para produção de uma vacina. Alguns pesquisadores produziram uma proteína recombinante (Ac-CP-2); que foi clonada e expressa na levedura *Pischia pastoris*, e utilizada em testes de vacinação experimental, nos quais se observou que em animais que foram vacinados com esta proteína e desafiados com *Ancylostoma caninum*, houve um enfraquecimento do parasito, com diminuição na produção de ovos, no entanto sem redução da anemia e da carga parasitária (LOUKAS et al., 2004).

Outro estudo, direcionado da mesma forma, avaliou a atividade de outra hemoglobina recombinante (Ac-APR-1) que após imunização dos animais utilizados no experimento, levou a uma pequena redução do número de parasitos no intestino, porém com uma redução significativamente elevada (85%) na postura de ovos, quando comparada com a do grupo não imunizado, bem como uma redução na perda sanguínea por parte dos cães (LOUKAS et al., 2005).

Estudos conduzidos por Fujiwara et al. (2007) levaram a clonagem, expressão em *Escherichia coli* e purificação da proteína Ac-16, que foi utilizada em vacinação experimental de cães, com resultados promissores relacionados com diminuição da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), bem como da anemia causada pela perda de sangue, trazendo suporte para novas pesquisas utilizando a tecnologia de DNA recombinante, que possam levar ao

desenvolvimento de uma vacina contra a ancilostomíase.

2.4.3 - Tratamentos alternativos

Um dos métodos alternativos para o controle de Ancylostomidae é o controle biológico, que pode ser utilizado para diminuir uma população de parasitos, através do uso de antagonistas naturais, destacando-se neste sentido os fungos nematófagos. A administração de fungos nematófagos a animais domésticos é considerada uma alternativa plausível para a profilaxia de helmintíases intestinais parasitárias (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003).

Os fungos nematófagos estão catalogados com mais de 150 espécies, sendo divididos em três grupos, a saber: a) fungos predadores de nematóides – que têm a capacidade de aprisionar e penetrar através da cutícula do nematóide, crescendo em seu interior e destruindo suas estruturas internas; b) fungos endoparasitos – que infectam os nematóides e absorvem o seu conteúdo interno; e c) fungos oportunistas, que colonizam o conteúdo do ovo ou ainda a larva contida em seu interior (MOTA; CAMPOS; ARAÚJO, 2003; MACIEL; ARAÚJO; CAMPOS, 2006).

Alguns isolados de fungos nematófagos foram testados e demonstraram capacidade de capturar, “in vitro”, larvas de *Ancylostoma* spp., sendo capazes de exercer atividade predatória, e portanto sendo considerados uma alternativa viável no controle populacional de larvas infectantes em nível ambiental (MACIEL; ARAÚJO; CAMPOS, 2006).

O estudo de extratos de plantas com atividade parasiticida também tem trazido grandes perspectivas para o controle da ancilostomíase, apesar das poucas evidências de eficácia antiparasitária da maioria das plantas estudadas até o presente momento. No entanto alguns compostos provenientes do metabolismo dessas plantas, à saber, proteinases e metabólitos secundários, dentre os quais, alcalóides, glicosídeos e taninos, têm demonstrado atividade antiparasitária dose-dependente (WOLPERT et al., 2008; GILTHIORI; ATHANASIADOU; THAMSBORG, 2006).

WOLPERT et al. (2008) observaram que alguns extratos de plantas provenientes do Haiti apresentam atividade inibitória contra larvas infectantes de

Ancylostoma caninum, interferindo em mecanismos fisiológicos envolvidos na alimentação destas, demonstrando desse modo a importância do desenvolvimento de pesquisas em fitoquímica, que possam levar ao desenvolvimento de novos medicamentos e estratégias de controle a este parasito.

2.4.4 – Probióticos

A microbiota gastrointestinal é bastante complexa, representando um ecossistema composto de cerca de 500 espécies, cada uma formada por diferentes cepas, sendo que menos de 50% destas já foram isoladas. (BJÖRKSTÉN, 2006). A superfície de mucosa do trato gastrointestinal de seres humanos adultos é colonizada por cerca de 10^{14} células de microrganismos, correspondendo a aproximadamente 10 vezes o número total de células do corpo humano, constituindo a mais importante fonte de estímulo microbiano, e provavelmente provém um sinal primário para direcionar a maturidade do sistema imune pós-natal e o desenvolvimento de uma imunidade balanceada. (HOOPER e GORDON, 2001). As bactérias que compõem a microbiota gastrointestinal são de grande importância ao organismo, provendo enzimas necessárias para assimilação ou síntese de alguns nutrientes, exercendo um importante papel na desintoxicação de componentes nocivos da dieta, além de representarem uma barreira natural contra patógenos (PINTO et al., 2006).

O termo probiótico foi introduzido por Elie Metchnikoff em 1908, que ao observar a longevidade de camponeses búlgaros que consumiam alimentos derivados de leite fermentado, sugeriu que os lactobacilos presentes nesse alimento apresentavam algum efeito oposto à ação putrefativa e tóxica conseqüentes do metabolismo do sistema digestório (OYETAYO & OYETAYO, 2005; TANNOCK, 2004; ÖTLES et al., 2003).

Probióticos são preparações constituídas de microrganismos vivos que, quando ingeridos em concentrações adequadas, afetam o hospedeiro de um modo positivo, por meio da modulação da imunidade sistêmica e de mucosa, bem como aperfeiçoando o balanço nutricional e a microbiota do trato gastrintestinal. As principais preparações probióticas usualmente encontradas no mercado são

constituídas por um amplo grupo de bactérias denominadas *Lactobacillus* que são constituintes normais e importantes da microbiota gastrointestinal do ser humano (PENNER; FEDORAK; MADSEN, 2005).

Para que uma espécie de microrganismo seja considerada probiótico existem vários critérios que devem ser considerados dentre os quais a capacidade de exercer um efeito positivo para saúde do hospedeiro, manter-se viável após passagem pelo TGI, aderir à camada de células epiteliais do intestino e colonizar a luz do TGI; produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos e estabilizar a flora gastrointestinal como, por exemplo, *Lactobacillus acidophilus* e *L. johnsonii* (PARVEZ et al. 2006; FELLE; MICHETTI, 2003).

Existe um interesse crescente com relação aos probióticos, no que diz respeito ao seu potencial em promover benefícios à saúde humana e animal. Nesse sentido, alguns mecanismos de ação têm sido postulados para explicar os efeitos benéficos desses microrganismos, incluindo prevenção do crescimento de bactérias patogênicas, produção de agentes antimicrobianos, tais como ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, estimulação da função de barreira da mucosa, efeito imunomodulatório favorável e promoção do estado de eubiose (HAMILTON-MILLER, 2003; PINTO et al; 2006).

Vários estudos têm demonstrado efeitos terapêuticos atribuídos aos probióticos em diversos quadros clínicos (Figura 3), dentre os quais: diarreia infecciosa (NOMOTO, 2005); diarreia associada a antibióticos (SJAWESKA; RUSZCZYNSKI; RADZIKOWSKI, 2006), intolerância e indigestibilidade da lactose (DE VRESE et al, 2001., PARVEZ et al, 2006); câncer colorretal (ROLLER et al, 2004; COMMANE et al, 2005); Síndrome do cólon irritável ((KAJANDER et al, 2005; NIV et al, 2005), doenças inflamatórias do cólon e colite ulcerativa (KAJANDER et al, 2005), alergias (FURRIE, 2005), hipercolesterolemia (GILL; GUARNER, 2004; NORIEGA et al, 2006) e infecções causadas por bactérias e parasitos patogênicos (PEREIRA, 2007; GHOSH; VAN HELL; PLAYFORD, 2006; PENNER; FEDORAK; MADSEN, 2005; SUZUKI et al.2006).

Figura 4. Efeitos benéficos resultantes do uso de probióticos – Adaptado (PARVEZ et al. 2006).

2.4.4.1 Uso dos Probióticos nos processos infecciosos

Para prevenir e tratar as modificações do ecossistema microbiano, pesquisadores ressaltam a importância dos microrganismos probióticos no sentido de combater o desequilíbrio da microbiota, bem como o isolamento e caracterização de cepas de microrganismos que atuam sobre agentes causadores de diarreia, tais como protozoários, helmintos e bactérias (LEI; FRIIS; MICHAELSEN, 2006).

Segundo Guerra et al. (2007) as pesquisas com probióticos têm sido direcionadas tanto pela maior demanda por métodos mais conservacionistas no que diz respeito ao tratamento e prevenção de infecções, quanto pela preocupação por parte da comunidade científica, com relação ao surgimento de cepas de microrganismos resistentes e ao uso descontrolado de agentes antimicrobianos.

Apesar da eficácia terapêutica comprovada desses medicamentos, em alguns casos o tratamento pode não ser efetivo em um primeiro momento, exigindo repetição, o que aumenta o nível de exposição bem como o risco do surgimento de efeitos colaterais. Sabe-se também que existem cepas de microrganismos resistentes ao tratamento convencional, tornando-se necessário a busca por novos agentes terapêuticos, que possam aprimorar o tratamento medicamentoso (UPCROFT; UPCROFT, 2001).

Têm-se demonstrado efeitos positivos de espécies de bactérias de vários gêneros, dentre os quais *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizadas isoladamente ou em conjunto com outras medidas terapêuticas, para o controle de diversos processos infecciosos causados por bactérias e até mesmo para diminuir os efeitos colaterais causados pelo uso de antibióticos – DAA (Diarréia antibiótico-associada) (COLLADO et al, 2005; GOTTELAND; BRUNSER; CRUCHET, 2006; SZAJEWSKA; RUSZCZYNSKI; RADZIKOWSKI, 2006).

Os principais mecanismos de inibição exercidos por espécies de lactobacilos sobre alguns patógenos consistem na produção de ácidos orgânicos de cadeia curta e a produção de bacteriocinas. Os ácidos orgânicos de cadeia curta como os ácidos acético, propiônico, butírico e láctico são produzidos pelas espécies probióticas durante o metabolismo de carboidratos. Estes ácidos induzem a diminuição do pH e podem inibir o crescimento de alguns patógenos (GOTTELAND; BRUNSER; CRUCHET, 2006).

As bacteriocinas são peptídeos com elevada atividade antimicrobiana, sendo produzidas não só por lactobacilos, como também por outros microrganismos probióticos, como *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis* e *Bifidobacterium*. Estes compostos são capazes de inibir o crescimento de microrganismos incluindo cepas resistentes a antibióticos (COLLADO et al, 2005; GOTTELAND; BRUNSER; CRUCHET, 2006).

2.4.4.2 Probióticos e infecções parasitárias

As drogas com atividade anti-helmíntica têm passado por considerável expansão e avanço, passando a constituir um arsenal com amplo espectro terapêutico, com excelente atividade após administração por diversas vias e em

alguns casos, capacidade de oferecer proteção persistente contra re-infecção (REINEMEYER; COURTNEY, 2001).

Apesar destes avanços, com desenvolvimento de drogas como nitazoxanida, Secnidazol e Ivermectina, o baixo padrão de efetividade dessas drogas, bem como de drogas convencionais observado no tratamento de indivíduos poliparasitados, os graves efeitos tóxicos que podem ser desencadeados em pacientes sensíveis e o risco do desenvolvimento de resistência às drogas antiparasitárias; fizeram surgir o consenso da necessidade de serem desenvolvidas novas estratégias para complementar o arsenal terapêutico disponível para o controle das enteroparasitoses (DUPOUY-CAMET, 2004; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al.; 2008; ANDRADE, 2009).

Diversos estudos foram realizados demonstrando a atividade de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus*, dentre outros, no tocante a infecção causada por protozoários patogênicos com ênfase para *Giardia duodenalis* (BENYACOUN et al., 2005; HUMEN et al., 2005), *Cryptosporidium* sp. (GUISARD et al, 2006, COUTINHO, 2008), *Eimeria* sp (LEE et al., 2007, PEREIRA, 2007), por meio da redução da taxa de infecção e da liberação de antígenos, bem como recuperação da mucosa danificada.

Com relação às helmintíases, segundo Oliveira-Sequeira et al. (2008), nas infecções por helmintos intestinais os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos ainda não estão bem elucidados, no entanto um dos mecanismos sugeridos é a estimulação da resposta imune inespecífica.

Esta hipótese foi aventada inicialmente ao se observar que a incidência, prevalência e intensidade da infecção causada por Ancylostomidae são menores em crianças que foram vacinadas por BCG (Bacilo-Calmette-Guerin), que, apesar de não ser uma bactéria probiótica, estaria, neste caso, estimulando a resposta imune não específica, de modo a diminuir a gravidade da ancilostomíase nas crianças submetidas à imunização (BARRETO et al. 2000; LIPNER et al. 2006).

Outros mecanismos foram evidenciados por GILL (2003), segundo o qual alguns probióticos podem interferir na regulação da expressão gênica de mucinas e na composição e excreção de muco, o que pode afetar negativamente o desenvolvimento de helmintos como *Trichinella spiralis*.

Ao inocular camundongos C57BL/10 oralmente com 1×10^9 UFC/ml de uma

cultura de *Zymomonas mobilis*, Santos et al. (2004) demonstraram que os animais que receberam a bactéria, após estabelecimento de infecção com *Schistosoma mansoni*, apresentaram uma redução de 61% na carga parasitária, quando comparados com o grupo controle, atribuindo-se a este resultado a eficiência da ativação do sistema imune, com evolução para morte dos parasitos no pico da elevação da resposta imune.

Resultados promissores também foram obtidos em experimentos realizados com camundongos infectados por *Trichinella spiralis*, que receberam inóculos de *Lactobacillus casei*, uma vez que após a administração de probióticos os autores observaram redução da carga parasitária e uma melhora na resposta imune celular, bem como ausência de encurtamento das vilosidades intestinais (BAUTISTA-GARFIA et al, 2001).

Segundo OLIVEIRA-SEQUEIRA et al. (2008), apesar dessas possibilidades, há uma quantidade incipiente de dados disponíveis sobre os efeitos da administração de probióticos no curso das infecções por helmintos intestinais, sendo restritos a poucas espécies de parasitos, e, no que diz respeito aos animais domésticos, a utilização terapêutica dos probióticos apresenta-se bastante promissora, no entanto necessitando de estudos para se estabelecer a relevância dessas terapias em cada situação específica.

3. METODOLOGIA

Avaliou-se a ação antiparasitária de três cepas de *Lactobacillus*, utilizadas na forma de “pool”, em cães infectados com espécies da família Ancylostomidae, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Taubaté - SP, durante os meses de Janeiro a Março de 2010, sendo submetido ao comitê de ética em pesquisa com animais da FAPI, e aprovado sob protocolo nº 009/2009.

3.1 Microrganismos probióticos

Foram avaliadas três cepas de *Lactobacillus* isoladas de fezes humanas que apresentam efeito probiótico comprovado (PEREIRA, 2007; COUTINHO, 2008), a saber: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4536 e *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20.

As cepas de *L. plantarum* e *L. acidophilus* são provenientes do laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo di Biasi, Volta Redonda - RJ, e a cepa de *L. delbrueckii* UFV H2B20 foi cedida pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG.

As cepas foram mantidas a 4 °C em agar MRS (Man, Rogosa e Sharp) composto por: peptona (10g/l), extrato de carne (8g/l), extrato de levedura (4g/l), glicose (20g/l), fosfato dipotássio (2g/l), acetato de sódio trihidratado (3g/l), citrato triamoniaco (3g/l), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2g/l), sulfato de manganês (0,05g/l), Agar (15g/l), Tween 80 (1mL/L).

Para o desenvolvimento dos ensaios as respectivas cepas foram reativadas a cada 15 dias em caldo MRS, pH 6,2, esterilizado a 121° por 15 min e incubadas a 37°C por 24 horas. A preparação probiótica que foi administrada aos animais, foi preparada na forma de “pool”, pela mistura de 1 mL de cada cultura contendo 1×10^6 unidades formadoras de colônia (UFC) de cada cepa. A contagem das bactérias foi realizada pela técnica de “pour plate” em agar MRS e, para confirmação da identidade das cepas, foram realizados testes de coloração de Gram e catalase.

A quantidade de 1×10^6 UFC foi determinada com base no Regulamento

Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados em Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, que estabelece uma concentração mínima de 1×10^6 UFC/ mL para que uma preparação seja considerada probiótica (BRASIL, 2002).

3.2 Seleção dos animais para experimentação

3.2.1 Critérios de elegibilidade dos animais: inclusão e exclusão

Nos grupos experimentais enquadraram-se animais de ambos os gêneros, com idade superior a um ano, sem nenhuma doença manifesta ou diagnosticada, e em cujas fezes foram encontrados apenas ovos de espécies da família Ancylostomidae, por meio da realização de exames coproparasitológicos, conduzidos nos laboratórios de Parasitologia da Faculdade de Pindamonhangaba (FAPI) e da Universidade de Taubaté (UNITAU).

Para compor os grupos controle foram selecionados 40 animais com idade superior a um ano de idade, sem nenhuma doença manifesta e em cujas amostras fecais não foi encontrada nenhuma estrutura parasitária. Cabe ressaltar que foram incluídos 20 cães não parasitados e 20 cães parasitados exclusivamente por Ancylostomidae.

Foram excluídos do estudo as cadelas prenhes, os canídeos com idade menor ou igual a um ano de idade, e os canídeos em cujas amostras fecais foram encontradas estruturas compatíveis com qualquer parasito intestinal, exceto os da família Ancylostomidae, bem como aqueles com sintomas clínicos ou diagnóstico confirmado de qualquer outra doença infecciosa ou severa. Também foram excluídos os animais parasitados que estavam sendo submetidos a tratamento com drogas antiparasitárias, ou que foram submetidos a este tipo de tratamento em um período inferior a 60 dias.

3.2.2 Definição dos Grupos

Partindo-se do pressuposto de que os ensaios em Parasitologia requerem

freqüentemente o uso de métodos não paramétricos para avaliação de tratamentos, e que, portanto, cada grupo experimental deve conter pelo menos seis observações (SAMPAIO, 2004; VERCRUYSSSE et al., 2001), no presente trabalho estabeleceu-se em 10 o número de cães para cada grupo, levando em consideração as possíveis mortes durante o desenvolvimento do experimento, sendo que cada grupo estabelecido foi agrupado em canil separado dos outros grupos.

3.2.3 Seleção de animais parasitados

Para seleção dos animais foram realizados exames coproparasitológicos antes da intervenção utilizando-se o Método de Willis (1921) que é específico para pesquisa de ovos de Ancylostomidae, e os Métodos de Faust et al. (1939), e de Ritchie (1948) modificado por Allen e Ridley (1970), sendo estas duas últimas técnicas realizadas com o intuito de evitar a inclusão de animais acometidos por outras parasitoses.

O método de Willis modificado (ANEXO A) consiste em uma técnica de flutuação espontânea, utilizada normalmente na rotina de diagnóstico coproparasitológico, que tem como fundamento a flutuação de estruturas parasitárias em solução saturada de Cloreto de Sódio ($d = 1,20\text{g/ml}$), sendo um método específico para detecção de ovos leves, como é o caso dos ovos de espécies da família Ancylostomidae;

O Método de Faust et al. (ANEXO B), que é utilizado para pesquisa de ovos leves e cistos de protozoários, tem por fundamento a flutuação por centrifugação destas estruturas em solução saturada de Sulfato de Zinco ($d = 1,18\text{g/ml}$).

O método de Ritchie modificado (ANEXO C) é um método de sedimentação por centrifugação em solução de formaldeído a 10% e acetato de etila, e no presente trabalho foi utilizado para pesquisa de outros parasitos, uma vez que se trata de um método menos específico, porém mais abrangente.

3.2.4 Coleta e processamento das amostras

Para evitar contaminação, a coleta do material fecal foi realizada diretamente na ampola retal dos cães, por profissional Médico-Veterinário e técnicos habilitados, sendo as amostras depositadas em coletores universais, sem adição de conservantes. O material fecal devidamente enumerado e recolhido foi encaminhado sob refrigeração para realização de exame coproparasitológico nos laboratórios de Parasitologia da FAPI e da UNITAU, utilizando-se os métodos descritos anteriormente.

As amostras de fezes foram mantidas sob refrigeração durante o período máximo de 48 horas entre a coleta e a realização das lâminas e para cada técnica realizada foram avaliadas 3 lâminas de cada amostra.

Após avaliação coproparasitológica, foi determinado o número de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais selecionados para compor os grupos experimentais, sendo que para este fim, uma fração da amostra coletada foi processada pelo Método de McMaster com modificações (ANEXO D) (Mcmaster, 1939), que é um método indicado, sobretudo, para avaliar quantitativamente as infecções por ancilostomídeos (NEVES, 2005). Para tanto um grama (1g) de fezes foi misturado a 14 mililitros (14ml) de solução de flutuação e um volume de 150µl da suspensão obtida foi transferido para uma câmara de contagem, para se determinar o número de ovos por grama (OPG) de fezes. A quantidade de fezes e o volume da solução de flutuação foram estabelecidos de modo a facilitar a contagem de ovos que foi determinada pela multiplicação do número de ovos encontrados sob a área delimitada por um fator de conversão.

A câmara de McMaster (Figura 5) apresenta dois compartimentos, cada um com um retícula gravada na superfície superior, que quando preenchidas permitem que a maior quantidade de detritos sedimente no fundo, enquanto os ovos leves flutuam e aderem na superfície abaixo da retícula, sendo facilmente contados. Deve-se preencher as duas áreas da câmara e após transcorridos 2 minutos, proceder a contagem de ovos em ambas as áreas da câmara. Cada compartimento embaixo da retícula comporta um volume de 0,15 ml (a área riscada é de 1 cm por 1 cm, e a profundidade é de 0,15 cm, perfazendo um total de 0,15 cm³ ou 0,15 ml. Examinando-se os dois compartimentos, o volume total

analisado será de 0,3 ml, que corresponde a 1/100 do volume total em que a amostra de fezes foi originalmente ressuspensa (1 grama em 15 ml). Para o cálculo de ovos por grama, a multiplicação deverá ser feita, portanto, por 50 (100 dividido por 2 gramas).

Figura 5 - Câmara de McMaster

3.3 Delineamento Experimental

Após seleção dos animais parasitados e não parasitados, 40 destes foram pesados e agrupados para compor quatro grupos, determinados da seguinte maneira:

1º Grupo (GITP). 10 animais parasitados com *Ancylostomidae* submetidos a tratamento com a preparação probiótica em estudo;

2º Grupo (GINT): 10 animais parasitados com *Ancylostomidae* e não submetidos a nenhum tratamento;

3º Grupo (GNINT): 10 animais clinicamente sadios, não parasitados e não tratados com a referida preparação probiótica;

4º Grupo (GNIP): 10 animais clinicamente sadios, não parasitados e aos quais foi administrada a preparação probiótica.

A preparação probiótica em estudo, constituída por um “pool” de cepas de *Lactobacillus*, previamente cultivadas em caldo MRS, foi diluída em leite desnatado para um volume final de 5ml, e administrada oralmente aos animais com auxílio de uma seringa por um período de 28 dias, sendo administrada em dias alternados.

Os cães foram monitorizados diariamente, principalmente no que diz respeito ao bem estar geral e a parâmetros clínicos, como presença de anorexia, diarreia ou vômitos.

Para avaliar a eficácia do tratamento com a referida preparação probiótica, foi realizada pesquisa de estruturas parasitárias nas fezes dos animais 1 dia antes e 7, 14, 21 e 28 dias após o início do experimento, utilizando o Método de Willis (1921) e a quantificação de ovos por grama (OPG) de fezes, utilizando Método de Macmaster (1939). Especificamente para o grupo GTP amostras de fezes foram coletadas por mais 14 dias após encerrado os respectivos tratamentos, para determinação do número de OPG.

O percentual de redução de OPG foi determinado empregando-se os valores das médias de OPG do primeiro dia antes de iniciado o tratamento (dia zero) e as médias das respectivas amostras coletadas, utilizando-se a seguinte fórmula, descrita por Jacobs et al. (1994):

$$\% \text{ de redução de OPG} = \frac{(\text{média de OPG (dia zero)} - \text{média de OPG (dia de interesse)})}{(\text{média de OPG (dia zero)})} \times 100$$

3.5 Hemograma e dosagem de IgE

Com o intuito de avaliar a evolução do estado anêmico e imune dos animais, amostras de sangue foram coletadas (1 dia antes de submeter os animais aos tratamentos e 7, 14 e 28 dias após iniciado o experimento) e encaminhadas para um laboratório de diagnóstico veterinário, onde foram realizados os respectivos hemogramas (eritrograma, leucograma, dosagem de hemoglobina e determinação de volume globular) e separado plasma para determinação dos níveis de anticorpo serico (IgE) pelo teste de ELISA.

As amostras de sangue (3 mL) foram coletadas através das veias radial ou braquial, por meio de punção do vaso com agulha ou cateter, sendo transferidas para tubos contendo EDTA. A contagem de eritrócitos e a contagem global de leucócitos foram realizadas em câmara de Neubauer (SANTOS; CARVALHO, 1994).

A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em esfregaço de sangue corado pelo método panótico, onde foram contados 100 leucócitos e

classificados de acordo com suas características morfológicas e tintoriais em neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e basófilos (SANTOS; CARVALHO, 1994).

O hematócrito, ou volume celular condensado, representa o volume relativo ocupado pelos eritrócitos em uma amostra de sangue e foi determinado, juntamente com a dosagem de hemoglobina, pelo método automatizado em aparelho Coulter ACT8.

Os níveis de IgE inespecífica foram determinados utilizando-se kit comercial específico para este fim (ensaio de imunoperoxidase para determinação de IgE canina, fabricante: Immunology Consultants Laboratory (ICL).

3.6 Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram avaliados conforme as características da distribuição amostral. Foram utilizados testes paramétricos (ANOVA e teste t de Student) e não paramétricos (Mann-whitney e Kruskal-Wallis), sendo empregados de acordo com a normalidade dos resultados, ao nível de significância de 5%, utilizando como ferramenta de apoio o software BIO ESTAT 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da preparação probiótica sobre Ancylostomidae em cães naturalmente infectados

O potencial do uso de probióticos em cães tem sido avaliado em poucos estudos nos quais foram consideradas diferentes variáveis, dentre as quais: digestibilidade e escore fecal (FELICIANO, 2008); capacidade imunoestimulante traduzida pela produção de anticorpos anti-leptospira (GONÇALVES et al., 2007) e diminuição da patogenia na gastroenterite viral hemorrágica (CAMARGO et al., 2006). Estes estudos foram conduzidos de maneira a se avaliar probióticos disponíveis no mercado, que apesar de apresentarem uma composição bastante heterogênea, não se mostraram totalmente persuasivos, no sentido de terem sua eficácia comprovada para as finalidades das quais foram avaliados.

No presente trabalho foi avaliada a eficácia do uso de três espécies de *Lactobacillus*, na forma de “pool”, no controle a ancilostomíase canina em cães naturalmente infectados. Para tanto foi constituído 1 grupo de 10 cães naturalmente infectados, que foram tratados com a referida preparação probiótica (GTP), e três grupos controle (GINT, GNINT e GNIP), também formados por 10 cães, com o intuito de inferir se a administração da preparação probiótica surtiu um efeito estatisticamente significativo no tratamento de ancilostomíase, sendo este efeito avaliado por meio da determinação do número de ovos nas fezes (OPG), o qual foi mensurado em intervalos de 7 dias após iniciado o tratamento, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 1.

A análise estatística dos resultados apresentados (Tabela 1) demonstrou que, um dia antes do início do tratamento (dia 0), os valores de OPG dos grupos GINT e GTP não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si. Entretanto, no 28º dia após iniciado o tratamento observou-se uma redução de 88,83% na contagem de ovos nas fezes, no grupo GTP, sendo esta redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparada a observada no grupo controle (GINT).

Tabela 1 - Valores médios do número de ovos por grama de fezes (OPG) e percentual de redução de OPG dos grupos de animais naturalmente infectados

	dia 0	dia 7		dia 14		dia 21		dia 28	
Grupo	Média*	Média	% de redução	Média	% de redução	Média	% de redução	Média	% de redução
GINT	3055	1835	39,93%(a)	2100	31,26%(a)	2193	28,01%(a)	2695	11,78%(a)
GITP	4075	2710	33.49%(a)	4555	-11,77%(a)	1595	60,85%(ab)	455	88,83%(b)

letras diferentes significam diferença significativa

(*) Média dos valores de OPG de 10 cães de cada grupo

Verifica-se ainda que, decorridos 14 dias do início do experimento, houve um aumento da contagem de OPG no grupo tratado com a referida preparação probiótica (GITP), sugerindo que o tratamento com probióticos inicialmente beneficiou o parasito. No entanto, este aumento pode estar relacionado com um fenômeno denominado “fecundidade dependente de densidade”, segundo o qual há um aumento da produção de ovos dos parasitos que sobrevivem a um tratamento anti-parasitário, devido a um abrandamento da contenção da produção de ovos (KOTZE; KOPP, 2008).

De acordo com estes pesquisadores, a contenção da produção de ovos está relacionada com a carga parasitária, sendo densidade-dependente, ou seja, quanto maior a quantidade de parasitos adultos no organismo do hospedeiro, menor é a postura de cada fêmea, e, após iniciado um tratamento antiparasitário eficaz, ocorre uma diminuição da carga parasitária, no entanto com um aumento da postura de ovos por parte das fêmeas que sobreviveram (KOTZE; KOPP, 2008).

O fenômeno de “fecundidade dependente de densidade” foi demonstrado diversas vezes (WALKER et al. 2009, KOTZE; KOPP, 2008, KOPP et al., 2008, CHURCHER; BASÁÑEZ, 2008, CHURCHER; FILIPE; BASÁÑEZ, 2006; BISHOP; STEAR, 2000) em infecções helmínticas, sendo também observado na ancilostomíase canina por Kopp et al. (2008), que demonstraram que, após administração de pamoato de pirantel a cães parasitados por *A. caninum*, houve uma redução de 71% de parasitos adultos no intestino, observada após necropsia, e, em contrapartida, um aumento de 41% na contagem de OPG.

No presente trabalho, os animais do grupo GITP foram monitorados, no tocante a postura de ovos nas fezes, por mais 14 dias após supressão do

tratamento com a preparação probiótica, sendo a determinação de OPG realizada nos dias 35 e 42, cujos resultados encontram-se representados na Figura 6. Observa-se um aumento dos valores de OPG, quando comparados aos determinados no 28º dia, permitindo sugerir que se torna de fundamental importância a inclusão da preparação probiótica na dieta dos animais, no sentido de garantir a manutenção de baixas contagens de OPG.

Figura 6. Valores de OPG no grupo de animais naturalmente infectados e tratados com preparação probiótica (GTP).

letras diferentes significam diferença significativa ($p < 0,05$)

O potencial do uso das cepas de *Lactobacillus* avaliadas no presente trabalho, no que concerne à atividade antiparasitária, também foi demonstrado por Coutinho (2008), no controle de criptosporidiose em camundongos infectados experimentalmente. Este autor avaliou uma preparação probiótica contendo 1×10^{12} UFC das mesmas cepas avaliadas no presente trabalho, que foi administrada duante 10 dias consecutivos sendo observado 100% de redução de oocistos de *Cryptosporidium parvum* nas fezes de camundongos.

As propriedades antiparasitárias de outros microrganismos têm sido comprovadas, dentre os quais *Zymomonas mobilis*, que apresentou efeitos antagônicos sobre bactérias, fungos e protozoários, bem como diminuição da carga parasitária em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, (SANTOS et al., 2004). Estes autores administraram $0,3 \times 10^9$ UFC de *Z. mobilis*, durante um período de 7 dias, a camundongos infectados com 100 cercárias de

S. mansoni e observaram uma redução significativa ($p<0,05$) da carga parasitária, quando comparada ao grupo controle.

Outros ensaios realizados por Teixeira et al. (1996), com camundongos experimentalmente infectados com 90 cercárias de *Schistosoma mansoni* mostraram que o tratamento prévio destes animais com uma preparação contendo *Corynebacterium parvum* resultou em 44% de proteção. A eficácia da preparação probiótica foi avaliada por meio de contagem de parasitos adultos no fígado, sendo este número significativamente menor ($p<0,05$) no grupo tratado, em relação aos valores observados no grupo controle, corroborando com os resultados observados no presente trabalho, que evidenciam o potencial do uso de probióticos para o controle de helmintíases.

Os efeitos positivos do uso de probióticos frente a infecções parasitárias também têm sido demonstrados em infecções causadas por helmintos da classe Nematoda, a qual pertence as espécies da família Ancylostomidae. No sentido de demonstrar a importância do uso de probióticos na dieta dos cães, Mussi, Mathos e Balthazar (2008) selecionaram 19 cães naturalmente infectados com ancilostomídeos, aos quais foi administrado um antihelmíntico composto de uma associação de drogas (febantel, pamoato de pirantel e praziquantel), juntamente com uma preparação probiótica de uso comercial, constituído de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacillus bifidum* e *Enterococcus faecium*. Estes autores forneceram aos cães duas doses de antihelmínticos juntamente com a preparação probiótica, intercaladas por um período de 15 dias, e observaram que o uso do produto probiótico interferiu positivamente nas condições clínicas dos cães tratados, evidenciando melhoria no aspecto clínico geral, no brilho da pelagem e nas características do material fecal.

Por outro lado Martinez-Gómez, Santiago-Rosales e Bautista-Garfias (2009) demonstraram a eficácia da administração de *Lactobacillus casei* Shirota no controle de *Trichinella spiralis*, parasito pertencente à classe Nematoda, que tem como hospedeiro diversas espécies de mamíferos, inclusive os canídeos. Estes autores administraram 1×10^8 UFC de *L. casei* Shirota, por via intraperitoneal, uma vez por semana, durante 3 semanas, a 60 camundongos CD1 e, após este período, desafiaram os animais com 200 larvas de *T. spiralis*. Os autores observaram que houve uma diminuição significativa ($p<0,05$) do

número de parasitos adultos no intestino dos animais, bem como um aumento significativo ($p < 0,05$) dos níveis de IgA na mucosa intestinal dos camundongos que foram tratados com probióticos, em relação aos valores observados no grupo controle. Cabe ressaltar que o aumento do nível de IgA específica observado pelos autores aconteceu apenas duas semanas após a redução da carga parasitária, indicando que a administração repetida de *L. casei* Shirota por via intraperitoneal consiste em uma ferramenta eficaz para indução de uma resposta imune inespecífica, que neste trabalho, foi de fundamental importância para o controle da triquinelose.

4.2 Hemograma

4.2.1 Efeito da preparação probiótica sobre o estado anêmico dos animais

De acordo com Brooker, Bethony e Hotez (2004), a perda de sangue é a principal manifestação clínica da ancilostomíase, levando comumente a deficiência de ferro, com consequente quadro de anemia microcítica (diminuição do tamanho das hemácias) e hipocrômica (diminuição da quantidade de hemoglobina).

A perda de sangue observada na ancilostomíase se deve tanto a hematofagia exercida pelo parasito, quanto a fixação dos vermes adultos na mucosa do intestino, que provocam rompimento de arteríolas e capilares teciduais, com consequente hemorragia. Além disso, o parasito libera substâncias inibidoras de fatores de coagulação, agravando o extravasamento sanguíneo.

No presente trabalho avaliou-se a capacidade da preparação probiótica, no sentido de influenciar no quadro de anemia dos animais infectados, cujos resultados encontram-se representados na Figura 7. Observa-se que antes do início do tratamento (T0) não se observou diferença estatisticamente significativa no tocante ao número de hemácias, entre os animais do grupo GTP (infectados e tratados com a preparação probiótica) e dos animais do grupo GINT (infectados e não tratados). No entanto após 28 dias de tratamento, os animais do grupo GINT apresentaram contagens de eritrócitos estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) as

observadas nos demais grupos, indicando que o tratamento com probióticos foi eficaz para estabilizar o quadro de anemia resultante da ancilostomíase.

Figura 7. Valores médios do número de hemácias no sangue periférico dos grupos de animais avaliados

letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

Esta estabilização do quadro de anemia pode estar relacionada com a redução de 88,83% do número de OPG observada no grupo GITP, que está diretamente relacionada com a diminuição do número de parasitos no intestino com consequente diminuição da espoliação de sangue, podendo também estar relacionada com a própria ação dos probióticos, que, segundo Silva et al. (2008), são capazes de aumentar a biodisponibilidade do ferro absorvível.

O aumento da biodisponibilidade de ferro, induzido por microrganismos probióticos no TGI, está relacionado principalmente com a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta (AOCC) tais como propionato, butirato e acetato, por parte das bactérias da microbiota intestinal. De acordo com SAKAI et al. (2000), os ácidos orgânicos de cadeia curta são os principais produtos da fermentação de frutooligossacarídeos por diferentes gêneros bacterianos no intestino grosso, que levam a diminuição do pH intestinal, ocasionando a solubilização de ferro e outros minerais, bem como de seus complexos previamente formados, que são melhor absorvidos pelo enterócito (SAKAI et al., 2000).

Os frutooligossacarídeos são fibras não-digeríveis no intestino delgado, sendo fermentadas no ceco e no cólon por bactérias da microbiota, que produzem

ácidos orgânicos de cadeia curta. Sakai et al. (2000) avaliaram o efeito da ingestão de frutooligossacarídeos de cadeia curta (Sc-FOS) na recuperação de anemia pós-gastrectomia em ratos de 4 semanas de idade. Os animais gastrectomizados foram divididos em 3 grupos e alimentados durante um período de 6 semanas, com dieta contendo sacarose, frutooligossacarídeos ou inulina. Os autores observaram que os valores de hemoglobina e hematócrito foram significativamente maiores nos animais que receberam a dieta contendo Sc-FOS.

As bactérias da microbiota também podem favorecer um aumento da absorção de ferro por outros mecanismos dentre os quais, aumento da absorção de cálcio e consequente diminuição de formação de complexos insolúveis com ferro, aumento da proliferação celular induzida pelos AOCC e aumento do tempo de trânsito intestinal (SILVA et al, 2008).

Silva et al. (2008) investigaram o efeito de uma bebida enriquecida com ferro e suplementada com *Lactobacillus acidophilus*, sobre o número de hemácias, concentração de hemoglobina e hematócrito de crianças em fase pré-escolar. Esses autores observaram que as crianças que receberam a bebida enriquecida com ferro e suplementada com *Lactobacillus* apresentaram número de hemácias maiores que os observados nas crianças que receberam apenas a bebida fortificada com ferro, bem como uma maior concentração de hemoglobina sérica, estando este aumento correlacionado com uma maior absorção de ferro.

O aumento do número de hemácias está relacionado com o aumento da absorção de ferro, que pode ser incrementada por meio da ação de probióticos (SILVA et al. 2008, SAKAI et al. 2000). Uma vez absorvido, o ferro se liga a transferrina, que transporta o ferro até a medula óssea, onde precursores eritróides captam este metal para produção da molécula de hemoglobina. Após esta etapa, os precursores eritróides amadurecem e formam as hemácias (eritrócitos), que migram para o sistema circulatório; desse modo, quanto maior a absorção de ferro, maior será o número de hemácias produzidas e a concentração de hemoglobina sérica (BELL, 1999; KLINE, 1996).

No presente trabalho os efeitos positivos da administração da preparação probiótica também podem ser perceptíveis ao se avaliar a concentração de hemoglobina nos animais dos diferentes grupos, conforme demonstrado na Figura 8. Observa-se que, no final do tratamento (T28), ocorreu uma redução

significativa na concentração de hemoglobina apenas no grupo GINT, estando esta redução provavelmente relacionada com a espoliação de sangue, que é provocada pelos parasitos na mucosa do intestino. Por outro lado, a redução da carga parasitária induzida pela administração dos probióticos ao grupo GITP, também induziu uma menor espoliação de sangue, permitindo que os valores de hemoglobina não diminuíssem significativamente.

Cabe ressaltar que mesmo nos animais não infectados (GNINT e GNIP) a concentração de hemoglobina (Figura 8) e a contagem de eritrócitos (Figura 7) permaneceram abaixo dos valores mínimos de referência, à saber: hemoglobina - 14 a 18g/dl e hemácias – 6 a 8 milhões por mm^3 de sangue.

Os valores reduzidos de concentração de hemoglobina e eritrócitos observados nos animais podem estar relacionados à ocorrência de infecções virais sub-clínicas, dentre as quais a cinomose, que pode levar a anemia e trombocitopenia em cães afetados. A cinomose é uma doença causada por um Morbillivírus, sendo altamente contagiosa entre cães e apresentando comumente uma elevada prevalência em canis, podendo, no entanto ser subclínica em 50% dos cães afetados (SILVA et al., 2005), sem a manifestação dos respectivos sintomas.

Figura 8. Valores médios da concentração de hemoglobina no sangue periférico dos grupos de animais avaliados
letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

4.2.2 Efeito da preparação probiótica sobre a contagem de leucócitos

A contagem global bem como a determinação qualitativa de leucócitos são duas determinações que compõem o hemograma e no presente trabalho foram utilizadas como ferramenta, para auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos no processo de cura da ancilostomíase canina, induzida pela preparação probiótica em estudo, e os resultados médios da contagem global encontram-se representados na Figura 9.

No que concerne à contagem global de glóbulos brancos, observa-se que antes do início do tratamento (T0) o valor médio de leucócitos do grupo GINT estava acima da faixa de valores de referência, que corresponde de 8 a 16 mil células por mm^3 de sangue, compatível com a existência de um processo infeccioso; Em contrapartida, no grupo GTP, apesar de haver um processo infeccioso patente, conforme evidenciado por meio de realização de exame coproparasitológico (Tabela 1), o valor médio de leucócitos se encontrava dentro da faixa dos valores considerados normais, não se observando diferença significativa entre os valores observados nos dois grupos (Figura 9).

Figura 9. Valores médios do número de leucócitos no sangue periférico dos grupos de animais avaliados

letras diferentes significam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

Entretanto, após 28 dias de tratamento com a referida preparação probiótica, observou-se uma inversão dos valores de leucócitos dos grupos GITP e GINT, haja vista o fato de que o número de leucócitos observado no grupo GITP foi superior aos valores de referência, enquanto que no grupo GINT estes valores se igualaram aos observados nos grupos de animais não infectados (Figura 9).

Ao se avaliar as variações dos valores globais de leucócitos no grupo GITP (Figura 10), é possível evidenciar que o número de leucócitos observado no decorrer das 3 últimas avaliações semanais (dias 14, 21 e 28) foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos observados nas duas primeiras semanas de acompanhamento experimental (dia 0 e dia 7) fato este que pode ter influenciado positivamente na redução do número de OPG que foi observada neste grupo, no vigésimo oitavo dia do tratamento (Tabela 1).

De acordo com Gill (2003), o consumo de leite fermentado contendo microrganismos probióticos, principalmente espécies de *Lactobacillus*, pode incrementar a função da resposta imune inata, com aumento do número de leucócitos, bem como da atividade fagocitária de leucócitos do sangue periférico, que pode se manter elevada por diversas semanas, mesmo depois de cessado o consumo de *Lactobacillus*, sendo esta melhora na resposta imune importante para a proteção contra infecções. Os autores enfatizaram ainda que este efeito é dependente da cepa e da dose do probiótico consumido, sendo importante o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a eficácia e a correlação entre a espécie e a dose da preparação probiótica a ser avaliada, principalmente no que tange ao estímulo da resposta imune.

Figura 10. Valores médios do número de leucócitos no sangue periférico do grupo GTP, no decorrer do tratamento com a preparação probiótica.

letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

No que diz respeito à contagem diferencial de leucócitos nos diferentes grupos, os valores de neutrófilos segmentados permaneceram dentro dos limites dos valores de referência, não permitindo inferências dignas de nota (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Figura 11. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GTP.

Letras diferentes significam diferença estatística nos valores de linfócitos ($p < 0,05$)

Não houve diferenças entre os valores de neutrófilos

Figura 12. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GINT

Figura 13. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico dos animais do grupo GNIP

Figura 14. Valores médios do número de linfócitos e neutrófilos segmentados no sangue periférico do grupo GNINT

A contagem global de leucócitos é determinada pelo número total de leucócitos observados em uma alíquota de sangue periférico. Por outro lado, na contagem diferencial cada subtipo de leucócito, dentre eles: neutrófilos, eosinófilos e linfócitos são contados independentemente. Dependendo do tipo de agente patogênico e da resposta imune por ele induzida, haverá um aumento na produção e ativação de um subtipo específico de leucócito. Nas infecções causadas por bactérias intracelulares, protozoários e vírus ou durante a passagem de larvas de helmintos pelo sistema circulatório, a resposta imune é do tipo Th-1, na qual os neutrófilos desenvolvem um papel fundamental, ao passo que na resposta imune a helmintos estabelecidos no intestino, a resposta imune é do tipo Th-2, onde não é necessariamente estimulada a diferenciação e produção de neutrófilos, devido a participação secundária dessas células neste tipo de resposta. Esta teoria explica a ausência da elevação dos níveis de neutrófilos observada no presente trabalho (MACHADO et al., 2004; WRIGHT et al., 2009).

De acordo com Machado et al. (2004), na resposta imune a helmintos, que é do tipo Th-2, os linfócitos T CD4⁺ são ativados e estas células são produtoras de citocinas, dentre as quais as Interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13, que, dentre outras funções, induzem a produção de IgE, pelos linfócitos B, bem como a ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, que são componentes fundamentais na defesa contra helmintos. A IL-4 estimula a produção de IgE, que em conjunto com a IL-13, leva a ativação de mastócitos nos tecidos, resultando na secreção de

mediadores do processo inflamatório (histamina e outros mediadores de hipersensibilidade imediata), secreção de muco e aumento da contratilidade da musculatura intestinal, culminando com a destruição e expulsão do parasito.

Verifica-se também (Figura 11) que os valores médios de linfócitos observados nos animais do grupo GTP, após o 21º e 28º dias foram significativamente superiores aos observados no dia 0 e no 7º dia de tratamento, bem como aos valores de referência (800 a 4160 linfócitos por mm³ de sangue), caracterizando, deste modo, um quadro de linfocitose. Este aumento significativo do número de linfócitos só foi observado nos animais desse grupo, enfatizando-se desse modo que a administração dos probióticos influenciou de forma positiva a resposta imune, pelo estímulo da produção de linfócitos. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que o pico de aumento do número de linfócitos do grupo GTP coincidiu com o período no qual evidenciou-se diminuição significativa do número de OPG nas fezes dos respectivos animais (Figura 6), ou seja, no 28º dia de experimento.

Os linfócitos desempenham um papel central na resposta imune, independentemente do agente patogênico, sendo responsáveis pelo direcionamento da resposta imune (Th1 ou Th2), papel este que é atribuído aos linfócitos T auxiliares (CD4+), bem como pela destruição direta do agente invasivo (linfócitos T citotóxico - CD8+) e pela produção de anticorpos, que é exercida pelos linfócitos B (MACHADO et al. 2004).

A capacidade de indução da resposta imune por parte dos probióticos, no que diz respeito ao aumento da contagem de linfócitos, foi demonstrada por Gonçalves et al. (2007). Estes pesquisadores avaliaram a capacidade imunoestimulante de uma preparação probiótica composta por 4×10^8 UFC/g de *Bacillus cereus* ATCC 9634 e *Bacillus subtilis* ATCC 3131, em cães vacinados contra leptospirose. A melhora na resposta imune foi avaliada por meio de realização de hemograma e dosagem de títulos de anticorpos produzidos, através das quais os autores observaram desenvolvimento de linfocitose para os animais vacinados que foram tratados com a preparação probiótica, sendo estes valores significativamente maiores do que os observados no grupo que foi apenas vacinado. Observaram também aumento da produção de anticorpos, cujos títulos se mantiveram elevados e estáveis, quando comparados aos observados no

grupo não tratado com a preparação probiótica, ressaltando deste modo que a administração de probióticos a animais previamente vacinados, induz a um desenvolvimento de resposta imune mais persistente, que pode ser fundamental para a eficácia desse tratamento em processos infecciosos.

Por meio da análise das variações da contagem de eosinófilos (Figura 15), pôde-se observar que também não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, porém, teoricamente esta observação não era esperada nos grupos de animais que estavam infectados com ancilostomídeos, haja vista o fato de que na ancilostomíase e em outras helmintíases, conforme já esclarecido anteriormente, há comumente um padrão de resposta imune caracterizada principalmente por eosinofilia, expressão de IL-4, IL-5 e IL-13, e aumento de produção de IgE (LOUKAS; PROCIV, 2001).

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos

Figura 15. Valores médios do número de eosinófilos no sangue periférico dos grupos de animais avaliados

Os eosinófilos são leucócitos que apresentam uma elevada concentração de grânulos citoplasmáticos, e a função dessas células nas infecções parasitárias está relacionada com a atividade citotóxica contra helmintos, que é observada após liberação do conteúdo dos grânulos (degranulação) no local onde está ocorrendo o processo infeccioso. A ação dos eosinófilos é dependente de IgE, de modo que quando essa célula se liga ao anticorpo na superfície do parasito, ocorre a degranulação, com a liberação de substâncias dentre as quais: MBP

(*Main Basic Protein* ou proteína básica principal) a EDN (*Eosinophil-derived Neurotoxin* ou Neurotoxina derivada de eosinófilo) e a EPO (*Eosinophil peroxidase*), que, em conjunto, auxiliam na destruição e expulsão do helminto (ZUO; ROTHENBERG, 2007; BROOKER; BETHONY; HOTEZ, 2008).

Durante a resposta imune a helmintos, a eosinofilia ocorre porque há um recrutamento destas células para o sítio da infecção. Em condições normais os eosinófilos se encontram difundidos nos tecidos e apresentam-se em baixas quantidades na circulação sanguínea, porém no decorrer do processo infeccioso causado por parasitos, podem ser encontrados em maior número na circulação, durante a migração dessa célula, da medula para o local da infecção (ZUO; ROTHENBERG, 2007).

Devido ao fato de que os animais já se encontravam infectados no início do presente trabalho, não foi possível determinar a quanto tempo o processo infeccioso havia se iniciado, e, sendo assim, também há uma dificuldade em se estabelecer uma teoria que venha a esclarecer a ausência de eosinofilia sanguínea que foi observada no presente trabalho (Figura 15). Por outro lado, pode-se aventar a possibilidade destes cães se encontrarem numa fase crônica avançada da infecção, que poderia ser caracterizada por uma elevada concentração de eosinófilos no intestino, sem que necessariamente houvesse um aumento de eosinófilos circulantes. No entanto não foi encontrado na literatura nenhum artigo que viesse a corroborar esta hipótese ou que pudesse auxiliar no sentido de explicar a ausência de eosinofilia observada no presente trabalho.

4.3 Efeito da preparação probiótica sobre a concentração de IgE circulante

De acordo com Oliveira-Sequeira, Ribeiro e Gomes (2008), o mecanismo de ação de probióticos contra os protozoários está relacionado com a inibição da adesão, bloqueio de receptores específicos, produção de bacteriocinas ou estimulação de algum componente do sistema imunológico pelas bactérias, aumentando a resistência contra estes microrganismos. Por outro lado, segundo estes autores os efeitos que envolvem a atividade antiparasitária não são totalmente conhecidos, sendo a estimulação da resposta imune inespecífica um dos possíveis mecanismos envolvidos.

Sabe-se que na ancilostomíase a concentração de IgE se encontra elevada, como consequência do direcionamento da resposta imune induzida pelo parasito (BROOKER; BETHONY; HOTEZ, 2004; LOUKAS; PROCIV, 2001). Observa-se que no início do acompanhamento dos animais e nas duas semanas finais do tratamento, não foram observadas diferenças significativas nas médias de concentração de IgE dos diferentes grupos estudados, independentemente de estes estarem ou não infectados (Figura 16).

Figura 16. Valores médios da concentração de IgE no sangue periférico dos grupos de animais avaliados

Letras maiúsculas indicam diferenças entre os grupos, letras minúsculas indicam diferenças no mesmo grupo

Por outro lado, no 14º dia do início do tratamento com probióticos a concentração de IgE do grupo GITP foi significativamente maior ($p < 0,0001$) que a observada nos grupos não infectados. As concentrações de IgE apresentadas durante esse período de experimentação podem ter sido responsáveis pelo desencadeamento de uma resposta imune eficaz, que culminou com a redução da contagem de OPG. A administração da preparação probiótica pode ter sido fundamental neste sentido, pois de acordo com Timmerman et al. (2004) a ação sinérgica dos microrganismos probióticos pode influenciar no sentido de favorecer a resposta imune, tornando-a mais rápida e eficaz.

Cabe ressaltar que as concentrações de IgE também se encontravam em níveis elevados no grupo constituído por animais infectados que não receberam a preparação probiótica, porém é provável que os *Lactobacillus* que foram

ministrados aos animais do grupo GTP tenham desempenhado um papel fundamental no sentido de conduzir a uma resposta imune efetiva, mediada pela indução de produção de IgE inespecífica, fato este que seria primordial para o controle da ancilostomíase (PRITCHARD; QUINNELL; WALSH, 1995).

Na ancilostomíase a IgE específica, cuja produção é impulsionada por fatores gerados e secretados pelo próprio parasito, não leva a eliminação deste, sendo a IgE inespecífica mais diretamente relacionada a diminuição da carga parasitária e conseqüente controle da parasitose, hipótese esta que foi cogitada por Pritchard, Quinnell e Walsh (1995). Ao avaliarem o papel desta imunoglobulina em humanos cronicamente infectados com *Necator americanus*, que é um parasito pertencente a família Ancylostomidae estes autores observaram uma menor quantidade e fertilidade de parasitos apenas em pacientes que apresentaram elevados níveis de IgE total.

Nas infecções crônicas os ancilostomídeos produzem e secretam substâncias que apresentam a capacidade de alterar e suprimir a resposta imune, com produção de citocinas anti-inflamatórias, anergia de linfócitos T ou produção de linfócitos T reguladores, clivagem de IgA e inibição de ação de proteases, mudanças estas que são fundamentais para colonização no intestino humano (HERMELIJN et al. 2010; CUÉLLAR; WU; MENDEZ, 2009; HEWITSON, GRAINGER; MAIZELS, 2009)

Em contrapartida, os probióticos podem exercer efeitos antagônicos que contrabalanceiam esta ação imunossupressora observada nas infecções parasitárias crônicas, por meio da indução de mecanismos da resposta imune inespecífica, que podem culminar com aumento da quantidade de células B, desenvolvimento de citocinas protetoras da resposta imune do tipo Th2, aumento da expressão antigênica, além de poderem desencadear mecanismos não imunológicos, como por exemplo, o aumento da produção de mucina (GILL, 2003, OLIVEIRA-SEQUEIRA; RIBEIRO; GOMES, 2008), fatores estes que em conjunto podem ter resultado na diminuição do número de OPG observado nos animais do grupo GTP.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- A preparação probiótica avaliada apresentou potencial positivo para o controle da ancilostomíase em cães naturalmente infectados.
- O quadro de anemia dos animais parasitados que receberam a preparação probiótica permaneceu estável;
- A administração da preparação probiótica aos cães parasitados induziu a uma ativação da resposta imune, traduzida por um aumento dos níveis de IgE e por um aumento significativo das contagens globais de leucócitos e de linfócitos.
- A administração da preparação probiótica aos cães induziu a uma diminuição do número de OPG nas fezes, no entanto, após cessar o tratamento estes valores tenderam a aumentar, enfatizando-se desse modo a importância da inclusão de uma preparação probiótica na dieta dos animais, como alternativa para mantê-los livres de parasitos.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados observados no presente trabalho permitem sugerir a realização de futuros experimentos, visando:

- a) Avaliar a reprodutibilidade dos resultados em uma escala maior, ou seja, aplicando a preparação probiótica em um número maior de animais;
- b) Avaliar o uso da preparação probiótica durante um intervalo de tempo maior, com o intuito de avaliar a possibilidade de 100% de eficácia a médio prazo;
- c) Avaliar a eficácia da preparação probiótica em cães infectados com outras espécies de helmintos;
- d) Avaliar por meio de citometria de fluxo as linhagens de linfócitos que são ativadas em animais naturalmente parasitados e tratados com a preparação probiótica;
- e) Avaliar por meio de ELISA as linhagens de anticorpos que estão sendo produzidas no decorrer do tratamento dos cães com probióticos
- f) Avaliar a capacidade preventiva de induzir proteção contra ancilostomíase em cães, através de administração da preparação probiótica previamente a indução de infecção dos animais.

REFERÊNCIAS

- ABIEL, S. M. H.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; SARAIVA, L. Q. Dirofilariose na Ilha de São Luís, Nordeste do Brasil – uma zoonose tropical. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 15, n. 2, p. 405-412, 1999.
- ANDRESIUK, M. V. et al. Encuesta copro parasitológico canina realizado em plazas publicas de la ciudad de Mar Del Plata, Buenos Aires, Argentina. **Parasitologia Latino americana**, v.58, n. 1, p.17-22, 2003.
- ANDRADE de, E. C. **Ensaio Clínico randomizado da nitazoxanida no tratamento de poliparasitoses intestinais no município da Zona da Mata, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Saúde) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 109p, 2009.
- ANTHONY, R. M. et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. **National Review Immunology**, v.7, n.12, p.975-987, 2007.
- ARASHIMA, Y. KUMASAKA, K. Pasteurellosis as zoonosis. **Internal Medicine**, v. 44, n. 7, p. 692-693, 2005.
- ARAÚJO, F. R. et al. *Larva migrans cutânea* em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p.84-85, 2000.
- ARAÚJO, J. V. Helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres**, v. 53, n. 307, p. 363-365, 2006.
- ARTIS, D. New weapons in the war on worms: identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. **International Journal of Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 723-733, 2006.
- BARRETO, L. M. et al. Lower hookworm incidence, prevalence and intensity in children with a Bacillus Calmette-Guerin vaccination scar. **Journal of Infectious Diseases**, v.182, n. 6, p. 1800-1803, 2000.
- BATISTA, H. B. C. R. et al. Caracterização de amostras do vírus da raiva, isoladas nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, com anticorpos monoclonais anti-lissavírus. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 260-262, 2008.
- BAUTISTA-GARFIAS C. R. et al. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. **Parasite**, v.8, n.2, p. 226S-228S, 2001.
- BAXTER, D. N.; LECK, I. The deleterious effects of dogs on human health: 2. canine zoonoses. **Journal of Public Health**, v. 6, n. 3, p. 185- 197, 2010.
- BENYACOUB, J. et al. *Enterococcus faecium* SF68 enhance the immune response to *Giardia intestinalis* in mice. **Journal of Nutrition**, v.135, p. 1171-1176, 2005.

BELL, S. G. An introduction to hemoglobin physiology. **Neonatal network**, v.18, n.2, p. 9-15, 1999.

BISHOP, S. C.; SEAR, M. J. The use of a gamma-type function to assess the relationship between the number of adult *Teladorsagia circumcincta* and total egg output. **Parasitology**, v.121, p. 435-440, 2000.

BJÖRKSTÉN, B. The gut microbiota: a complex ecosystem. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 1215-1217, 2006.

BOWMAN D. D. et al. Effects of milbemycin oxime on adult *Ancylostoma caninum* and *Uncinaria stenocephala* in dogs with experimentally induced infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n.1, p. 64-67, 1991.

BRASIL, Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados em Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Resolução RDC nº 2, de 7 de Janeiro de 2002.

BROOKER, S, BETHONY, J; HOTEZ, P. J. Human hookworm infection in the 21st century. **Advances in Parasitology**, v. 58, p. 197-288, 2004.

CAMARGO, P. L. de, et al. Avaliação do efeito da suplementação terapêutica com probiótico em cães filhotes com gastrenterite hemorrágica. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, n.3, p. 453-462, 2006.

CAPUANO. D. M.; ROCHA, G. M. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do Município de Ribeirão Preto, SP – Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.9, n.1, p. 81-86, 2006.

CASTRO, J. M. de; SANTOS, S. V. dos; MONTEIRO, N. A. Contaminação de canteiros da orla marítima do Município de Praia Grande, por ovos de *Ancylostoma* e *Toxocara* em fezes de cão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.2, p.199 – 201, 2005.

CHURCHER, T. S.; BASÁÑEZ, M. G. Density dependence and the spread of anthelmintic resistance. **Evolution: International Journal of organic evolution**, v. 62, p. 528-537, 2008.

CHURCHER, T. S.; FILIPE, J. A.; BASÁÑEZ, M. G. Density dependence and the control of helminth parasites. **Journal of Animal Ecology**, v. 75, 1313-1320, 2006.

COLLADO, M. C. et al. Antimicrobial peptides are among the antagonist metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.385–391, 2005.

COMMANE, D. et al. The potencial mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. **Mutation Research**, v.591, p. 276-289, 2005.

COUTINHO, T. S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre *Cryptosporidium parvum* em camundongos C57BL/6 imunossuprimidos**. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

CRESPILHO, A. M. et al. Abordagem terapêutica do paciente neonato canino e felino – Aspecto relacionados a terapia intensiva, antiparasitários e antibióticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n.4, p. 425-432, 2007.

CUÉLLAR, C.; WU, W.; MENDEZ, S. The hookworm tissue inhibitor of metalloproteases (Ac-TMP-1) modifies dendritic cell function and induces generation of CD4 and CD8 supressor cells. **PLoS Neglected tropical diseases**, v. 3, p. 1-9, 2009.

DE VRESE, M. et al. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinic and Nutrition**, v. 73, p. 421 – 429, 2001.

DELAYTE, E. H. et al. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 31-38, 2006.

DEVANEY, E. The end of the line for hookworm? an update on vaccine development. **Plosmedicine**, v.2, p. 948-950, 2005.

DUPOUY-CAMET, J. New drugs for the treatment of human parasitic protozoa. **Parassitologia**, v. 46, p. 81-84, 2004.

FELICIANO, M. A. R. **Suplementação de probiótico para filhotes case da raça Beagles recebendo alimentos comerciais**, 2008. 105 p. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – Universidade Federal de Lavras.

FELLEY, C. P. e MICHETTI, P. Probiotics and *Helicobacter pylori*. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, v.17, p.785-791, 2003.

FERREIRO, L. et al. Zoonoses micóticas em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, supl. 2, p. s296 – s299, 2007.

FUJIWARA, R. T. et al. Reduction of worm fecundity and canine host blood loss mediates protection against hookworm infection elicited by vaccination with recombinant Ac-16. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 3, p. 281-287, 2007.

FUNADA, M. R. et al. Frequência de parasitos gastrintestinais em cães e gatos atendidos em hospital-escola veterinário da cidade de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.5, p. 1338-1340, 2007.

FURRIE, E. Probiotics and allergy. **Proceedings on the Nutrition Society**, v. 64, p. 465-469, 2005.

GILL, H. S. Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. **Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 755-773, 2003.

GILL, H. S. e GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. **Postgraduated Medicine Journal**, v. 80, p. 516 – 526, 2004.

GILTHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for controlo f gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 308-320, 2006.

GHOSH, S.; VAN HEEL, D.; PLAYFORD, R. J. Probiotics in inflammatory bowel disease: is it all gut flora modulation? **Gut**, v.53, p.620 – 622, 2006.

GONÇALVES, M. et al. Avaliação da capacidade imunoestimulante e da estabilidade de um probiótico empregado em rações de case. **Archives of Veteinary Science**, v.12, n. 2, p. 25-30, 2007.

GOTTELAND. M.; BRUNSEN, O.; CRUCHET, S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.23, p.1077-1086, 2006.

GRANDEMANGE, E. Field evaluation of the efficacy and safety of a combination of oxantel/pyrantel/praziquantel in the treatment of naturally acquired gastrointestinal nematodeand/or cestode infestations in dogs in Europe. **Veterinary Parasitology**, v.145, p. 94-99, 2007.

GUERRA, N. P. et al. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. **Animal Feed Science and Technology**, v.134, n. 1-2, p. 89-107, 2007.

GUISARD et al. Experimental studies of the effects of probiotics on *C. parvum* infection in neonatal rats. **Parasitology Research**, v. 99, n. 5, p. 522-527, 2006.

GÜRTLER, T. G. R.; DINIZ, L. M., NICCHIO, L. Microepidemia de tinha de couro cabeludo por *Microsporum canis* em creche de Vitória – Espírito Santo (Brasil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 267-272, 2005.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.22, p. 360-366, 2003.

HERMELIJN, H et al. Chronic helmint infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Current Allergy and Asthma Reports**, v.10, n. 1, p. 3-12, 2010.

HEWITSON, J. P.; GRAINGER, J.; MAIZELS, R. M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, p.1-23, 2009.

HOTEZ, P. J. et al. Experimental approaches to the development of a recombinant hookworm vaccine. **Immunology Review**, v.171, p. 163-171, 1999.

HUMEN, M. A. et al. *Lactobacillus johnsonii* antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p.1265-1269, 2005.

HOOPER, L.; GORDON, J. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v. 292, p. 1115-1118, 2001.

JACOBS, D. E. et al. World association for the advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics for dogs and cats. **Veterinary Parasitology**, v.52, p. 179-202, 1994.

JOFFE, D. J. SCHLESINGER, D. P. Preliminary assessment of the risk of *Salmonella* infection in dogs fed raw chicken diets. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 42, n. 6, p. 441-442, 2002.

KAJANDER, K. et al. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.22, p. 387-394, 2005.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Zoonoses causadas por parasitos intestinais de case e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 74, n. 2, p. 175-184, 2007.

KLINE, N. E. A practical approach to the child with anemia. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 10, n. 3, p. 99-105, 1996.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v.31, p. 336-345, 2001.

KOPP, S. R. et al. Phenotypic characterization of two *Ancylostoma caninum* isolates with different susceptibilities to the Anthelmintic Pyrantel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 3980-3986, 2008.

KOTZE, A. C.; KOPP, S. R. The potential impact of density dependent fecundity on the use of the faecal egg count reduction test for detecting drug resistance in human hookworm. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, p. 1-6, 2008.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalência de endoparasitas em cães da area urbana do Município de Montenegro, Rondônia. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 73, n.2, p.183-193, 2006.

LALLO, M. A.; BONDAN, E. P. Prevalência de *Cryptosporidium* sp. em cães de instituições da cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 120-125, 2006.

LANDMAN, J. K.; PROCIV, P. Experimental human infection with the dog hookworm, *Ancylostoma caninum*. **The medical Journal of Australia**, v. 178, p. 69-71, 2003.

LEE, M. S. et al. Influence of *Pediococcus*-based probiotic on coccidiosis in broiler chickens. **Poultry science**, v. 86, n. 1, p. 63-66, 2007.

LEI, V.; FRIIS, H.; MICHAELSEN, F. F. Spontaneously fermented millet product as a natural probiotic treatment of diarrhoea in young children: An intervention study in Northern Ghana. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 246-253, 2006.

LEITE, L. C. et al. Ocorrência de ovos de *Ancylostoma* spp. E *Trichuris* spp. Em fezes de case em meia-praia, Itapema, Santa Catarina, Brasil. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 65, p. 105-110, 2006.

LIAO, C. W. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among children in Swaziland, southern Africa. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 73 – 80, 2010.

LIPNER, E. M. et al. Coincident filarial, intestinal helminth and mycobacterial infection: helminths fail to influence tuberculin reactivity, but BCG influences hookworm prevalence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V. 74, n.5, p. 841-847, 2006.

LORENZINI, G.; TASCA, T.; de CARLI, G. A. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 2, p. 137-145, 2007.

LOUKAS, A. et al. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection. **Plosmedicine**, v.2, p. 1008-1017, 2005.

LOUKAS, A. et al. Vaccination of dogs with a recombinant cystein protease from the intestine of canine hookworms diminishes the fecundity and growth of worms. **Journal of infectious diseases**, v.189, p. 1952-1961, 2004.

LOUKAS, A.; PROCIV, P. Immune responses in hookworm infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 689-703, 2001.

MACHADO, P. R. L. et al., Mecanismos da resposta imune as infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MACIEL, A. L.; ARAÚJO, J. V. de; CAMPOS, A, K. Vaibilidade sobre larvas infectantes de *Ancylosotma* spp. dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monocrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura..**Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n.1, p. 182-187, 2006.

MACPHERSON, C. N. L. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1319-1331, 2005.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; SANTIAGO-ROSALES, R.; BAUTISTA-GARFIAS, C. R. Effect of *Lactobacillus casei* Shirota strain intraperitoneal administration in CD1 mice in the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-T *spiralis* production. **Veterinary Parasitology**, v.162, p. 171-175, 2009.

MENELAOS, L. A.; SMARAGDA, K. E. Prevalence of hookworm parasites in dog from the area of Thessaloniki and their zoonotic importance. **Buletin USAMV**, v. 63, p. 297-303, 2006.

MILLER, T. A. Industrial development and field use of the canine hookworm vaccine. **Advances in Parasitology**, v.16, p. 333-342, 1978.

MIRANDA, F. J. B. et al. Parasitismo por ancilostomatídeos em cães (*Canis familiaris*) domiciliados em Campos dos Goytacazes, RJ. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1042-1045, 2008.

MOLINA, C. P.; OGBURN, J.; ADEGBOYEGA, P. Infection by *Dipylidium caninum* in an infant. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.127, n.3, p.157-159, 2004.

MORAES, F. R. et al. Eficácia de dois sistemas de tratamento anti-helmíntico em filhotes de cães com infecção natural. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 61-66, 2004.

MORCHAN, R. et al. Zoonotic *Dirofilaria immitis* infections in a province of Northern Spain. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 3, p. 380-383, 2010.

MORO, F. C. B. et al. Ocorrência de *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* spp. Em praças e parques públicos dos municípios de Itaqui e Uruguaiana, fronteira oeste de Rio Grande do Sul. **Biodivers. Pampeana**, v.6, n.1, 2008.

Disponível em:

<http://www.revistaeletronica.purcrs.br/ojs/index.php/biodiversidadepampeana>
Acesso em 12/10/08.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n.3, p. 93-100, 2003.

MUSSI, E. M.; MATTOS JÚNIOR, D. G.; BALTHAZAR, L. M. C. Associação de febantel, pamoato de pirantel, praziquantel e probiótico em cães (*Canis familiaris*) naturalmente infectados por ancilostomídeos. **Pubvet, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 18, 2008.

Disponível em <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=217>

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

NIV, E. et al. The efficacy of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the treatment of patients with Irritable Bowel Syndrome – a double blind, placebo-controlled, randomized study. **Clinical Nutrition**, V.24, p.925-931, 2005.

NOMOTO, K. Prevention of infection by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.100, n. 6, p. 583-592, 2005.

NORIEGA, L et al. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. **International Dairy Journal**, v. 16. p.850-855, 2006.

OLIVEIRA, V. S. F. et al. Ocorrência de helmintos gastrintestinais em cães errantes na cidade de Goiânia – Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 4, p. 279 – 283, 2009.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. .F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2670-2679, 2008.

OYETAYO, V. O., OYETAYO, F. L. Review: Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.2, p.123-127, 2005.

ÖTLES, S., ÇAGINDI, Ö., AKÇIÇEK, E. Commentary: Probiotics and Health. **Asian Pacific Journal of Cancer Preview**, v.4, p.369-372, 2003.

PALMER, C. S. The veterinary and public health significance of hookworm in dogs and cats in Australia and the status of *A. ceylanicum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n.30, p.304-313, 2007.

PARVEZ et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171-1185, 2006.

PENNER, R.; FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Current Opinion in Pharmacology**. v.5, p.596-603, 2005.

PEREIRA, C.A.S. **Avaliação do efeito de microrganismos probióticos sobre Eimeria spp em Rattus norvegicus**. 76f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

PERRIGOU, J. G.; MARSHALL, F.; ARTIS, D. On the hunts for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites. **Cell Microbiology**, v. 10, n. 9, 1757-1764, 2008.

PIMPÃO, C. T. et al.; Avaliação dos efeitos toxicológicos da ivermectina em cães. **Revista Acadêmica**, v. 3, n. 4, p.19-24, 2005.

PINTO, M. G. V. et al. *Lactobacillus spp.* with in vitro probiotic properties from

human faeces and tradicional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.3, p.205-210, 2006.

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Animais domésticos como reservatórios de espécies termófilas de *Campylobacter*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 32, n. 2, p. 83-85, 2000.

PONTE, E. V.; RIZZO, J. A.; CRUZ, A. A. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 33, n. 3, p. 335-342, 2007.

PRATS, A. et al. **Neonatologia e Pediatria canina e felina**. São Paulo: Interbook, 2005.

PRITCHARD, D. I. The survival strategies of hookworms. **Parasitology Today**, v.11, p. 255-259, 1995.

PRITCHARD, D. I.; QUINNELL, R. J.; WALSH, E. A. Immunity in humans to *Necator americanus*: IgE, parasitic weight and fecundity. **Parasitic Immunology**, v. 17, p. 71-75, 1995.

REINEMEYER, R.; COURTNEY, H. Antinematodal drugs. In: Adams, H. R. (Ed.) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Iowa State University Press/ Iowa State p. 947-979, 2001.

ROBERTSON, L. D.; THOMPSON, R. C. Enteric parasitic zoonosis of domesticated dogs and cats. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 867-873, 2002.

ROLLER, M. et al. Intestinal Immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*. **British Journal of Nutrition**, v.92, p.931-938, 2004.

RUIZ, V. L. A. et al. Isolamento de Rotavírus de case assintomáticos no Brasil. **Arquivos brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n. 4, p. 996-999, 2009.

SAKAI, K. et al. The effects of short-chain fructooligosaccharides in promoting recovery from post-gastrectomy anemia is stronger than that of ilunin. **Nutrition Research**, v.20, n.3, p.403-412, 2000.

SALB, A. L. et al. Dogs as sources and sentinels of parasites in humans and wildlife, Northern Canada. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 60-63, 2008.

SAMPAIO, I. B. M. aspectos importantes da experimentação em parasitologia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 178-179, 2004.

SANTOS, F. A. G. dos, et al. Ocorrência de parasitas gastrintestinais em cães (*Canis familiaris*) com diarréia aguda oriundos da região metropolitana de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p.

257-268, 2007.

SANTOS, J. F. M. et al. The effect of *Zymomonas mobilis* culture on experimental *Schistosoma mansoni* infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.6, p. 502-504, 2004.

SANTOS, M. V.; CARVALHO, C. B. Variações no hemograma de cães submetidos experimentalmente a processo inflamatório e tratados com escina sódica (Reparil). **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.1, n.1, p. 60-71, n. 1994.

SANTOS, S. V.; CASTRO, J. M. Ocorrência de agentes parasitários com potencial zoonótico de transmissão em fezes de cães domiciliados no município de Guarulhos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 73, n. 2, p. 255-257, 2006.

SCOTT, D. W.; MILLER JR., W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5 ed., Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p. 158-255.

SILVA, A. S. et al. Prevalência de parasitismo em cães domiciliados num bairro de Santa Maria – RS. **Saúde, Santa Maria**, v. 33, n.1, p. 27-31, 2007.

SILVA, I. N. G. et al. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.

SILVA, M. R. et al. Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplement with *Lactobacillus acidophilus*. **Nutrition Research**, v. 28, p. 226-232, 2008.

SILVA, M. S. S. da, **Rastreio de parasitas gastrintestinais, pulmonares, cutâneos e musculares em canídeos domésticos e Silvestres no norte de Portugal**. 2010. 119p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

SJAWESKA, H.; RUSZCZYNSKI, M.; RADZIKOWSKI, A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Pediatrics**, v.149, p.363-372, 2006.

SOARES, M. P. et al. Intoxicação por Disofenol em caprinos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 155, 157, 2001.

STULL, J. W. et al. Small animal deworming protocols, client education and veterinarian perception of zoonotic parasites in western Canada. **Canine Veterinary journal**, v. 48, p. 269-276, 2007.

SUZUKI, T. et al. A past history of gastric ulcers and *Helicobacter pylori* infection increase the risk of gastric malignant lymphoma. **Carcinogenesis**, v.27, n.7, p.1391-1397, 2006.

SZAJEWSKA, H. M. D.; RUSZCZYNSKI, M. M. D.; RADZIKOWSKI, A.M.D. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta

analysis of randomized controlled trials. **The journal of Pediatrics**, September, 2006

TANNOCK, G. W. A special fondness for Lactobacilli. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.6, p.3189-3194. 2004.

TEIXEIRA, K. M. et al. Effects of non-specific immunopotentiators in experimental *Schistosoma mansoni* infection. II. *Corynebacterium parvum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 359-363, 1996.

TIMMERMAN, H. M. et al. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics – comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 291-233, 2004.

UGBOMOIOKO, U. S.; ARIZA, L.; HEUKELBACK, J. Parasites of importance for human health in Nigerian dogs: high prevalence and limited knowledge of pet owners. **BMC Veterinary Research**, v. 4, n. 48, p.1-9, 2008.

UPCROFT, J. A.; UPCROFT, P. Drug susceptibility testing of anaerobic protozoa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 06, p.1810 – 1814, 2001.

VASCONCELLOS, M. C.; BARROS, J. S. L., de; OLIVEIRA, C. S. Parasitas gastrointestinais em cães institucionalizados no Rio de Janeiro, RJ, **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 321-323, 2006.

VERCRUYSSSE, J. et al. International harmonization of anthelmintic efficacy guidelines (part 1). **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 171-193, 2001.

WALKER, M. et al. Density-dependent effects on the weight of female *Ascaris lumbricoides* infections of humans and its impacts on patterns of egg production. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. 1, p. 1-18, 2009.

WALTON, S. F. Genetically distinct dog-derived and human-derived *Sarcoptes scabiei* in scabies-endemic communities in Northern Australia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 542-547, 1999.

WAN, Y. Y.; FLAVELL, R. A. How diverse – CD4 effector T cells and their functions. **Journal of Molecular and Cellular Biology**, v.1, n.1, p.20-36, 2009.

WILLIAMSON, A. L. A multi-enzyme cascade of hemoglobin proteolysis in the intestine of blood-feeding hookworms. **Journal of biology and chemistry**, v. 279, p. 35950-35957, 2004.

WOOLHOUSE, M. E. J.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 12, 1842-1847, 2005.

WOLPERT, B. J. et al. Plant vermicides of Haitian Vodou show in vitro activity against larval hookworm. **Journal of Parasitology**, v. 94, n.5, p. 1155- 1160,

2008.

WRIGHT, V. J. et al. Early exposure of infants to Gi Nematodes induce Th2 dominant responses which are unaffected by periodic anthelmintic treatment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n.5, p. 1-12, 2009.

ZUO, L.; ROTHENBERG, M. E. Gastrointestinal eosinophilia. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 27, n.3, p. 443-455, 2007.

ANEXO A

Método de Willis

Diluir aproximadamente 2g de fezes em 10ml de solução saturada de NaCl ($d=1,2\text{g/ml}$). Transferir para um frasco de Borrel, completando o volume até a borda do frasco. Colocar na abertura do frasco uma lâmina que deverá estar em contato com o líquido. Deixar em repouso por cinco minutos, e, após findo este tempo, retirar rapidamente a lâmina, voltando para cima a parte que entrou em contato com o líquido. Cobrir com lamínula, levar ao microscópio e examinar com objetiva de 10x.

ANEXO B

Método de Faust com adaptações

Diluir 2g de fezes em 10ml de água filtrada e homogeneizar bem. Filtrar através de gaze dobrada em quatro, em um copo plástico e transferir para um tubo de centrifuga de 15 ml. Centrifugar por 1 minuto a 600 giros. Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento em água. Esta operação (lavagem) deve ser repetida até que o líquido sobrenadante esteja bem claro. Desprezar o líquido sobrenadante e ressuspender o sedimento com uma solução de sulfato de zinco 33% ($d=1,18\text{g/ml}$). Centrifugar novamente por um minuto a 600 giros e coletar a película sobrenadante, que deve ser recolhida com alça de platina, colocada numa lâmina junto com uma gota de lugol e coberta com uma lamínula. Examinar em objetiva de 10 e 40x.

ANEXO C

Método de Ritchie modificado

Diluir aproximadamente 2g de fezes diluídas e homogeneizar em 10ml de formalina tamponada com fosfatos. Transferir 7 ml da suspensão obtida para tubo cônico de centrifuga com capacidade para 15ml, e acrescentar 3ml de acetato de etila comercial. Fechar o tubo, agitar vigorosamente e levar para centrifuga durante 3 minutos a 350g. Desprezar o sobrenadante contendo os resíduos fecais, gordura e acetato de etila e reservar o sedimento para exame. Examinar duas alíquotas de aproximadamente 50 μ l de cada amostra, acrescidas de uma gota de lugol, entre lâminas e lamínulas de microscopia. Utilizar objetiva de 10x e 40x para a leitura e rastreamento completo das lâminas.

ANEXO D

Método de McMaster

- Pesar 1 grama de fezes;
- diluir com 14 ml de solução salina saturada (NaCl d=1,20 g/ml);
- Homogeneizar bem a suspensão e transferir para um coletor universal ou recipiente similar, passando-a através de gaze dupla;
- Sob homogeneização, retirar uma alíquota com pipeta volumétrica ou pipeta Pasteur e aplicar com cuidado em cada um dos compartimentos da Câmara de McMaster, tomando-se o cuidado de preencher completamente cada área correspondente a uma retícula;
- Deixar a Câmara em descanso por cinco minutos e examinar em microscópio, contando progressivamente os parasitos encontrados;

Para o cálculo da opg, deve-se multiplicar a soma dos ovos encontrados nos dois compartimentos por 50.

Fundamento do método:

Cada compartimento embaixo da retícula comporta um volume de 150µl, já que a área riscada possui dimensão de 1cm de comprimento por 1cm de largura, e a profundidade de 0,15 cm, perfazendo desse modo um total de 0,15cm³ ou 0,15ml (150µl). Ao se examinar as duas áreas da Câmara, o volume total analisado é de 0,3ml, que corresponde a 2/100 do volume total da suspensão de fezes obtida inicialmente (1/15 – 1g em 14ml de solução de NaCl). Assim, o cálculo de opg deve ser feito multiplicando o número de ovos contados nos dois compartimentos por 50.

APÊNDICE A – Valores de OPG nos grupos GINT e GITP

grupo GINT						grupo GITP							
	dias de experimento						dias de experimento						
Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	35	42
1	2750	2500	1450	2230	4650	11	10900	4200	4400	4550	1450	3500	2500
2	550	550	1400	1250	1300	12	2800	2000	950	750	0	1500	1000
3	550	700	500	700	650	13	3250	3350	2750	1000	2650	2700	1550
4	7400	5100	6800	7000	8000	14	9750	12050	23300	7350	0	8500	5900
5	3150	1550	1900	1500	2500	15	4000	3200	5000	1550	450	1350	1200
6	3000	500	550	600	600	16	200	200	550	0	0	250	300
7	6800	5100	5000	5750	6000	17	7000	1550	7750	700	0	0	8486
8	650	50	150	200	400	18	300	300	350	0	0	0	0
9	1200	2000	1850	1600	1900	19	750	250	500	50	0	300	400
10	50	300	1400	1100	950	20	1800	0	0	0	0	0	0
média	3055	1835	2100	2193	2695	média	4075	2710	4555	1595	455	1810	2133,6

APÊNDICE B – concentrações de IgE dos grupos estudados

grupo GINT				grupo GITP						grupo GNINT						grupo GNIP					
	dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	10	10	9,3	11	6,5	5	5,5	6,6	8,2	21	20	14	12	15	12	31	21	16	13	14	9
2	13	10	9	12	11	18	13	20	8	22	7,8	8	6,3	8	7	32	18	17	15	14	12
3	9	8	8	13	15	21	15	18	13	23	14	14	11	14	14	33	13	16	13	14	11
4	10	9	7	14	11	9	6,6	5,7	6	24	13	14	11	15	9	34	14	12	14	17	14
5	10	7	6,1	15	12	11	10	13	10	25	16	14	12	11	10	35	13	18	11	8,2	12
6	15	11,5	9	16	21	17	14	18	14	26	9	11	17	16	10	36	16	14	11	14	12
7	7,5	8	6	17	12	16	10	14	11	27	10	11	9	10	9	37	12	10	12	11	13
8	8	7	7,8	18	7,5	8,3	7,5	8,4	7,1	28	20	14	11	19	10	38	19	20	12	14	10
9	10	9	7	19	14	12	11	14	14	29	12	11	15	15	10	39	9	16	7,8	8,5	8
10	9	8	9	20	11	10	11	13	13	30	16	13	12	14	10	40	14	18	13	19	14
média	10,2	8,75	7,7	média	12	12,7	10,8	13,9	10,4	média	13,8	12	11,6	13,7	10,1	média	14,9	15,7	12,7	14,6	11,5

APÊNDICE C – valores globais de eritrócitos nos grupos estudados

grupo GINT				Grupo GITP						Grupo GNINT						grupo GNIP					
	dias de experimento				Dias de experimento						Dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	5400	5200	4900	11	3900	3500	3600	4000	4500	21	8000	7480	5710	6700	5880	31	8700	7300	6000	6000	4450
2	6810	7000	5700	12	5500	7900	5440	8400	4700	22	4400	4700	3900	4500	4200	32	7700	7600	6190	6480	5800
3	4800	4600	4200	13	7170	8700	6770	7900	6550	23	6890	6600	5910	6200	6000	33	6370	7000	5710	6510	5600
4	5200	4900	4200	14	5700	4800	4000	3700	3800	24	6000	6330	5400	7110	4800	34	7610	5960	6210	7400	6670
5	5300	5000	3900	15	6000	6200	5200	6100	5600	25	7300	6720	6140	5910	5100	35	6200	7600	5400	4600	6420
6	7000	7000	6000	16	8700	7600	6000	8000	6000	26	4900	5910	7560	7400	5000	36	7100	7000	5500	7000	5710
7	4300	4000	3000	17	5800	7400	5100	6000	5700	27	5000	5370	7800	5100	4800	37	6100	5300	5130	5600	6160
8	4700	4000	4400	18	4300	4120	4300	4600	4300	28	8200	8810	5400	8300	5300	38	8200	8500	5600	6000	5300
9	5000	5000	3900	19	6400	6000	5600	6200	6270	29	6100	6000	6520	6600	5350	39	4700	8800	4400	4600	4500
10	4800	4400	4500	20	5000	4900	5100	6150	6450	30	7760	6240	6000	6500	5200	40	7810	8000	6190	7150	6600
Média	5331	5110	4470	Média	5847	6112	5111	6105	5387	Média	6455	6416	6034	6432	5163	média	7049	7306	5633	6134	5721

APÊNDICE D – valores globais de leucócitos dos grupos estudados

grupo GINT				Grupo GITP						grupo GNINT						grupo GNIP					
	dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	18600	19000	17500	11	3800	11900	8100	3800	6200	21	18600	14500	13400	16000	10800	31	7900	13000	12300	10000	15700
2	13500	13000	10000	12	14000	6500	13600	17800	18700	22	10600	21100	16200	25000	26200	32	9900	9500	14500	14600	12200
3	21200	20300	17000	13	11000	9800	14900	18000	13300	23	8200	11200	8900	21000	11900	33	9400	6300	7700	5600	8700
4	2700	3000	2900	14	9200	6200	12000	6600	6400	24	7600	13000	12100	8900	8400	34	19600	10400	7500	8300	8200
5	11600	10000	6100	15	11000	10000	16000	17000	17000	25	8000	14700	18700	16200	12200	35	11600	7700	15100	31100	13900
6	13300	13800	12500	16	12800	16500	19500	24300	23900	26	8900	18500	5800	8100	8400	36	8200	9400	10900	10900	12100
7	41400	38000	34200	17	6800	9100	19800	14600	13900	27	7500	12800	11500	15600	12600	37	7300	6200	6300	6600	6800
8	19900	8100	6500	18	9400	7500	16100	30800	26000	28	3300	12900	11900	4800	5300	38	9500	6700	18600	17700	15600
9	15200	13000	13500	19	15700	10400	16100	17600	20200	29	8400	13000	11100	11600	12900	39	10200	3700	11000	10800	11900
10	22200	21000	16100	20	17000	19500	23200	20000	21200	30	7500	16400	15200	15100	12000	40	7400	4600	7600	9200	10200
média	17960	15920	13630	média	11070	10740	15930	17050	16680	média	8860	14810	12480	14230	12070	média	10100	7750	11150	12480	11530

APÊNDICE E – valores de linfócitos dos grupos estudados

Grupo GINT				Grupo GITP						grupo GNINT						grupo GNIP					
	dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	2976	2850	3675	11	380	3213	2268	798	1736	21	10602	4785	6432	6720	3996	31	1975	2730	2337	3500	3297
2	2025	1324	2100	12	6160	2665	5712	9256	7854	22	2862	2954	5994	5000	4978	32	1881	3135	4495	3942	3782
3	2120	2233	3230	13	2200	2744	3576	4860	3990	23	2788	1792	4272	6300	2261	33	2632	2646	3234	2184	3654
4	999	69	1015	14	828	1860	2880	2244	1664	24	2660	3250	2420	2759	2436	34	4900	4472	2700	2656	2706
5	3248	4100	2135	15	2530	2300	4000	3910	4930	25	2480	3675	7293	6156	5246	35	4640	3465	10721	10885	6811
6	4655	4416	4625	16	3200	3135	2535	5103	5019	26	4272	5550	2146	3240	4032	36	2624	2726	2616	1744	3872
7	9108	12540	6703	17	816	2639	3762	3504	4587	27	1950	3968	3680	5928	4284	37	2190	1798	1953	1188	1700
8	2388	1944	1365	18	2726	1875	2093	3696	4420	28	1551	5160	7021	2544	4655	38	2185	2613	3348	5487	4056
9	4864	4550	3078	19	4239	4784	4186	7990	6666	29	2184	2080	2664	3248	5289	39	2448	1961	5940	4860	7854
10	9102	9870	7245	20	3060	2200	6032	4600	5300	30	1875	4100	3192	5285	4080	40	2294	1380	3648	5060	4182
Média	4149	4390	3517	média	2614	2742	3704	4596	4617	Média	3322	3731	4511	4718	4126	média	2777	2693	4099	4151	4191

APÊNDICE F – valores de neutrófilos dos grupos estudados

Grupo GINT				grupo GITP						grupo GNINT						grupo GNIP					
	Dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	12648	13680	11900	11	3154	8330	5265	2812	3906	21	7068	9280	6566	8480	6480	31	5767	10010	9348	6000	11775
2	10655	9460	7500	12	6580	3185	7280	8366	9911	22	6254	15614	10044	18750	20960	32	7128	5700	8845	9782	7686
3	17384	15428	13600	13	6600	6174	10579	12600	8645	23	4920	8512	4450	13680	8925	33	5358	3276	4312	3136	4524
4	1350	1770	1790	14	7820	4154	8880	4224	4736	24	4028	8190	8470	6141	5796	34	12544	5616	4200	5063	4674
5	7192	5700	3782	15	7700	6500	11520	11200	11390	25	4800	9849	10098	9720	6344	35	6960	3927	4077	18660	5977
6	6650	7452	6500	16	9216	11055	15405	17496	16491	26	4450	11100	3364	4536	4200	36	5248	6392	7194	8393	6897
7	29394	24700	23940	17	5440	5642	14256	10074	9313	27	5175	8320	7475	9048	7812	37	4672	4030	4032	5148	4760
8	16716	6075	4680	18	5828	5325	13041	24640	20020	28	1518	7482	4522	1776	8246	38	6840	3618	14332	11328	10764
9	8968	7930	8100	19	10048	4992	10000	8272	12120	29	5628	9490	7992	7772	7353	39	6834	1665	4400	5724	3927
10	11988	10710	7889	20	13430	18700	19024	15200	15688	30	5475	10988	11704	9211	7680	40	4514	2852	3800	3864	4998
Média	12295	10291	8968	média	7582	7406	11525	11488	11222	Média	4932	9883	7469	8911	8380	média	6587	4709	6454	7710	6598

APÊNDICE G – valores de eosinófilos dos grupos estudados

Grupo GINT				grupo GITP						grupo GNINT						grupo GNIP					
	Dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento						dias de experimento				
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	7	14	21	28
1	2418	209	1750	11	152	119	405	38	372	21	558	145	268	160	216	31	79	260	123	400	314
2	405	260	300	12	980	585	407	0	748	22	848	1688	0	250	0	32	396	570	870	584	488
3	424	203	170	13	1430	784	596	360	399	23	410	0	89	420	714	33	658	315	77	224	522
4	354	240	116	14	460	124	120	66	0	24	912	520	726	0	84	34	1568	208	525	498	820
5	464	0	61	15	550	200	320	170	510	25	400	588	1112	324	610	35	0	231	151	1244	973
6	1862	1794	1250	16	256	1485	975	1458	1912	26	178	1295	116	243	84	36	246	188	981	545	1210
7	1242	720	684	17	408	637	1584	876	0	27	150	256	230	468	378	37	365	372	252	132	68
8	199	81	65	18	658	225	644	308	520	28	198	129	238	36	399	38	380	402	744	708	624
9	760	390	270	19	1099	416	966	1232	1414	29	420	650	111	464	129	39	816	74	550	216	119
10	666	420	644	20	510	0	2320	200	212	30	0	0	152	453	240	40	444	230	152	276	816
média	879	432	531	média	650	458	834	471	609	média	407	527	304	282	285	média	495	285	443	483	595

APÊNDICE H – concentrações de IgE dos grupos estudados

grupo GINT				grupo GITP						grupo GNINT				grupo GNIP			
	dias de experimento				dias de experimento						dias de experimento				dias de experimento		
Animais	0	14	28	Animais	0	7	14	21	28	Animais	0	14	28	Animais	0	14	28
1	30044,35	12088,70	3688,81	11	131057,90	161327,94	187260,07	173366,63	157695,89	1	53885,27	68884,21	60454,59	1	16726,22	19319,44	17464,69
2	90203,47	122859,07	137877,39	12	150720,77	146129,30	175384,53	111996,77	102566,79	2	29528,73	10511,06	16401,65	2	1467,48	13138,67	11146,53
3	192300,52	189149,17	184984,57	13	33050,11	42855,86	48016,52	40460,14	8837,86	3	19320,81	18179,11	12061,34	3	88632,09	130011,88	103169,33
4	19147,70	15472,55	31057,59	14	91817,79	124168,45	19688,67	4646,32	14639,50	4	21876,33	21510,90	22436,74	4	35883,37	65722,50	75468,52
5	31804,64	40116,67	32491,59	15	102418,00	143518,91	156553,68	103710,51	155134,89	5	131986,71	106056,60	48259,94	5	118806,10	159043,85	188402,12
6	153230,58	154364,04	168764,10	16	16350,13	96344,65	149667,06	68547,56	33442,38	6	63783,75	55450,76	47234,55	6	88142,64	53829,79	76026,66
7	10294,71	10511,10	1819,54	17	109523,87	122936,35	131986,71	88472,28	65954,35	7	17775,32	16110,09	14967,03	7	47750,33	57032,66	46960,35
8	194232,55	199367,46	156330,42	18	171596,52	118806,10	139173,99	93397,76	55228,90	8	16401,65	18856,43	17550,72	8	23844,68	27210,71	32173,88
9	114718,79	94376,66	61669,54	19	131986,71	106056,60	190515,44	118806,10	106056,60	9	13413,44	13851,09	14353,69	9	106715,89	137963,25	154046,33
10	6851,40	20504,42	2051,38	20	53885,28	29528,74	131986,71	88142,64	99933,65	10	18179,13	21345,65	30312,65	10	10511,00	35900,55	26815,71
média	84282,87	85880,98	78073,49	média	99240,71	109167,29	133023,34	89154,67	79949,08	média	38615,11	35075,59	28403,29	média	53847,98	69917,33	73167,41