Sérgio Vieira dos Santos

Alterações comportamentais em *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados por *Toxocara cati* ou *T. canis*

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi**

**São Paulo
2010**

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Santos, Sérgio Vieira dos

Alterações comportamentais em *Rattus norvegicus*
experimentalmente infectados com *Toxocara cati* ou *T. canis* / Sérgio
Vieira dos Santos. – São Paulo, 2010.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Pedro Paulo Chieffi

Descritores: 1. TOXOCARÍASE. 2. HELMINTOLOGIA. 3.
COMPORTAMENTO ANIMAL. 4. FORÇA MUSCULAR. 5. RATOS. 6.
INFECÇÃO EXPERIMENTAL ANIMAL.

USP/IMTSP/BIB-01/2010.

Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Candidato: **Sérgio Vieira dos Santos**

Título da Dissertação: “**Alterações comportamentais em *Rattus norvegicus* infectados por *Toxocara cati* ou *T. canis***”

Orientador: **Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada em/...../....., considerou

() **APROVADO(A)** () **REPROVADO(A)**

Examinador(a)

Assinatura

Nome.....

Instituição

Examinador(b)

Assinatura.....

Nome

Instituição

Presidente

Assinatura

Nome.....

Instituição.....

Dedico este trabalho

Aos meus pais Aluizio dos Santos “*in memoriam*” e Aparecida Vieira dos Santos, pelo carinho, dedicação e exemplo de coragem que foram fundamentais para minha formação.

Aos meus amigos João Manoel de Castro, Carmelita Rodrigues e Maria Auxiliadora pelo incentivo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi pela paciência, incentivo e sabedoria, com quem muito aprendi.

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo nas pessoas de seus professores e funcionários, que me possibilitaram ampliar meus conhecimentos.

À secretária do curso de Pós-Graduação Solange Fernandes Ferreira dos Santos pela paciência, atenção e dedicação durante esses dois anos e meio de convivência.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia, na pessoa do Prof. Dr. Hudson Souza Buck, que permitiu o uso do Laboratório de Comportamento, bem como os equipamentos necessários para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos/SP na pessoa da funcionária Renata que me auxiliou na coleta dos vermes adultos de *T. canis*.

À Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano do Laboratório de Helminologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela acolhida amigável e colaboração incessante no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos e colaboradores João Victor Luisi de Moura e Matheus Barbieri dos Santos que me auxiliaram na parte experimental do trabalho.

À Sra. Adyles Mendes Linhares pelo cuidado e dedicação dispensadas aos animais utilizados no trabalho durante o período que permaneceram no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, bem como pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Manoel Carlos S.A. Ribeiro, que me orientou na análise estatística dos dados.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Daniel Maurício dos Santos e Martinho José de Castro, pelo cuidado com os animais durante o período em que permaneceram no Biotério da Santa Casa/FCMSCSP.

Aos Bibliotecários Sonia Pedrozo Gomes e Carlos José Quinteiro da Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela paciência, colaboração e orientação na estrutura e formato da dissertação.

À Maisa Leite Queiroz, Maria Cristina Nakhle, Clarice Pires Abrantes Lemos, Kátia Maria de Oliveira, Francisca de Fátima Valentin, Sra. Joana Maria D'arc de Jesus, Ana Maria Gonçalves da Silva, Dirce Mary Correia Lima, Maria Cristina Conceição

Melo funcionárias do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – LIM06 que durante esses cinco anos de convivência, me ajudaram a vencer todas as dificuldades e me foram de todo carinho e dedicação.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho chegasse ao fim, os meus mais profundos agradecimentos.

“A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído”

Confúcio

RESUMO

Santos SV. *Alterações comportamentais em Rattus norvegicus experimentalmente infectados por Toxocara cati ou T. canis* (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2010.

Toxocara canis e *T. cati* são nematódeos parasitos de cães e gatos, transmitidos pela ingestão de ovos larvados, pela via transmamária, por predação de hospedeiro paratênico e via transplacentária; essa última via ocorre na infecção por *T. canis*. Muitos parasitos apresentam mecanismos para alterar o comportamento de seus hospedeiros e garantir sua transmissão. Vários pesquisadores demonstraram ocorrência de alterações comportamentais, utilizando camundongos como modelo de hospedeiro paratênico para *T. canis*. Porém, não há na literatura, estudos sobre a ocorrência de alterações de comportamento de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados por *T. cati*. Os objetivos do presente trabalho foram verificar a distribuição de larvas de *T. cati* em exemplares de *R. norvegicus* e determinar as fases miotrópica e neurotrópica na infecção deste parasito; bem como comparar comportamentos de fêmeas e machos deste roedor experimentalmente infectado com inóculo de *T. canis* ou *T. cati*, nos períodos agudo e crônico da infecção. As variáveis avaliadas foram: ansiedade, atividade motora e força muscular. Inicialmente utilizaram-se 21 ratos com idade de oito semanas, infectados com 300 ovos de *T. cati*. Nos dias 3, 5, 8, 10, 15, 30 e 60 pós-infecção três animais foram mortos para contagem das larvas em seus órgãos. A seguir foram utilizados 50 exemplares fêmeas e 50 machos de *R. norvegicus*, com seis a oito semanas. Para cada sexo os animais foram divididos em três grupos: *T. canis* – 20 ratos infectados com 300 ovos de *T. canis*, *T. cati* – 20 ratos infectados com 300 ovos de *T. cati* e controle – 10 ratos sem infecção. Nos dias 5, 15, 40 e 70 após a infecção, os animais dos grupos infectados e controle foram submetidos à avaliação das variáveis comportamentais e determinação da força muscular. Pôde-se verificar que a fase neurotrópica das larvas ocorreu principalmente no 15º dpi e 30º dpi. A fase miotrópica ocorreu em todo o período do experimento, porém especialmente no 15º e 60º dpi. Em relação à força muscular das fêmeas, pode-se observar diferença significativa nos três grupos apenas no 40º dpi. Nos machos houve diferença significativa entre os três grupos durante todo experimento. Nas variáveis comportamentais, somente as fêmeas do grupo infectado com *T. canis* apresentaram diferença significativa no 40º dpi em relação ao grupo controle. Os machos não apresentaram diferenças significantes na avaliação do comportamento. Pode-se concluir que *T. cati* teve comportamento migratório diferenciado, exemplares de *R. norvegicus* independente do sexo apresentaram maior decréscimo na força muscular quando infectados com *T. cati* e que apenas fêmeas infectadas por *T. canis* tiveram seu comportamento alterado permanecendo por mais tempo em condições de exposição em campo aberto.

Descritores: Toxocaríase. Helmintologia. Comportamento animal. Força muscular. Ratos. Infecção experimental animal.

ABSTRACT

Santos SV. *Behavioral changes in experimentally infected Rattus norvegicus by Toxocara cati or T. canis* (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2010.

Toxocara canis and *T. cati* are parasitic nematodes of dogs and cats, transmitted by the ingestion of embryonated eggs, by the transmammary and transplacental routes or by predation of paratenic hosts harboring third-stage larvae in their bodies. The transplacental route occurs only in *T. canis* infection. Many parasites have mechanisms to change the host's behavior in order to ensure their transmission. Several researchers have demonstrated the occurrence of behavioral changes, using mice as a model of paratenic host for *T. canis*. However, there are no studies on the occurrence of changes in behavior of *Rattus norvegicus* experimentally infected with *T. cati*. The aims of this study were to investigate the distribution of *T. cati* larvae in *R. norvegicus* and determine the myotropic and neurotropic phases in the infection of this parasite, and to compare behavior of male and female rodents experimentally infected with either *T. canis* or *T. cati*, in the acute and chronic periods of infection. The variables measured were: anxiety, motor activity and muscle strength. Initially we used 21 rats aged eight weeks, infected with 300 eggs of *T. cati*. On days 3, 5, 8, 10, 15, 30 and 60 post-infection three animals were killed to count the larvae in the organs and muscle. In the second experiment 50 females and 50 males of *R. norvegicus*, with six to eight weeks of age were used. For each sex the animals were divided into three groups: *T. canis* - 20 rats infected with 300 eggs of *T. canis*, *T. cati* - 20 rats infected with 300 eggs of *T. cati* and control - 10 rats infection free. On days 5, 15, 40 and 70 post-infection, the infected animals and control groups were submitted to evaluation of behavioral variables and determination of forepaws' muscle strength. It was verified that the neurotropic phase of larvae occurred mainly in the 15th dpi and 30 dpi. Myotropic phase occurred during all experimental period, but especially 15th and 60th dpi. In regard to muscle strength in females, a significant difference in the three groups was observed only after 40th post-infection. In males there was significant difference among the three groups throughout the experiment. In the behavioral variables, only the female of the group infected with *T. canis* showed significant differences after 40th dpi when compared to control group. Males showed no significant differences in the performance evaluation. It can be concluded that *T. cati* migration behavior was different, *R. norvegicus* regardless of sex showed greater decrease in muscle strength when infected with *T. cati* and only infected females by *T. canis* showed behavioral changes remaining more time under conditions of exposure in the open field.

Descriptors: Toxocariasis. Helminthology. Animal behavior. Strength muscle. Experimental animal infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ovos larvado e infértil de <i>Toxocara cati</i> de cultura <i>in vitro</i>	31
Figura 2	Aparelho <i>Grip strength meter for rats</i>	34
Figura 3	Labirinto em cruz elevado	35
Figura 4	Gaiola para movimentação espontânea em campo aberto (<i>Activity Cage</i>)	36
Figura 5	Média da frequência de entrada de <i>Rattus norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e <i>head dipping</i> no Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção.....	42
Figura 6	Média do tempo de permanência de <i>R. norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção	42
Figura 7	Média da frequência de entrada de <i>R. norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e <i>head dipping</i> no Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção.....	43
Figura 8	Média do tempo de permanência de <i>R. norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção	44
Figura 9	Média da frequência de entrada de <i>R. norvegicus</i> machos no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e <i>head dipping</i> no Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção	45
Figura 10	Média do tempo de permanência de <i>R. norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção	45
Figura 11	Média da frequência de entrada de <i>R. norvegicus</i> machos no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e <i>head dipping</i> no Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção	46
Figura 12	Média do tempo de permanência de <i>R. norvegicus</i> fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção	47

Figura 13	Média dos movimentos vertical e horizontal de fêmeas de <i>Rattus norvegicus</i> , com 41 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	48
Figura 14	Média da imobilidade e <i>grooming</i> de fêmeas de <i>R. norvegicus</i> , com 41 dias de infecção avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	48
Figura 15	Eliminação de <i>pellets</i> fecais de fêmeas de <i>R. norvegicus</i> após 41 dias de infecção com <i>T. canis</i> e <i>T. cati</i> e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto	49
Figura 16	Média dos movimentos vertical e horizontal de fêmeas de <i>R. norvegicus</i> , com 71 dias de infecção e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto	49
Figura 17	Média da imobilidade e <i>grooming</i> de fêmeas de <i>R. norvegicus</i> , com 71 dias de infecção avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	50
Figura 18	Eliminação de <i>pellets</i> fecais de fêmeas de <i>R. norvegicus</i> após 71 dias de infecção com <i>T. canis</i> e <i>T. cati</i> e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto	50
Figura 19	Média dos movimentos vertical e horizontal de machos de <i>R. norvegicus</i> , com 41 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	51
Figura 20	Média da imobilidade e <i>grooming</i> de machos de <i>R. norvegicus</i> , com 41 dias de infecção avaliados no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	51
Figura 21	Eliminação de <i>pellets</i> fecais de machos de <i>R. norvegicus</i> após 41 dias de infecção com <i>T. canis</i> e <i>T. cati</i> e avaliados com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto	52
Figura 22	Média dos movimentos vertical e horizontal de machos de <i>R. norvegicus</i> , com 71 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	53
Figura 23	Média da imobilidade e <i>grooming</i> de machos de <i>R. norvegicus</i> , com 71 dias de infecção avaliados no teste de atividade motora espontânea em campo aberto	53
Figura 24	Eliminação de <i>pellets</i> fecais de machos de <i>R. norvegicus</i> após 71 dias de infecção com <i>T. canis</i> e <i>T. cati</i> e avaliados com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média das larvas de <i>T. cati</i> recuperadas de órgãos e tecidos de <i>R. norvegicus</i> experimentalmente infectados em diferentes dias pós-infecção	39
Tabela 2	Valor médio da força muscular e do peso de <i>R. norvegicus</i> fêmeas aos 5,15 e 42 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	40
Tabela 3	Valor médio da força muscular e do peso de <i>R. norvegicus</i> machos aos 5, 15 e 42 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	41
Tabela 4	Média das variáveis de comportamento no labirinto em cruz elevado de <i>R. norvegicus</i> fêmeas aos 40 e 70 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	76
Tabela 5	Média das variáveis de comportamento no labirinto em cruz elevado de <i>R. norvegicus</i> machos aos 40 e 70 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	77
Tabela 6	Média das variáveis de comportamento em campo aberto – Actômetro - de <i>R. norvegicus</i> fêmeas aos 41 e 71 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	78
Tabela 7	Média das variáveis de comportamento em campo aberto – Actômetro - de <i>R. norvegicus</i> machos aos 41 e 71 dias após infecção por <i>T. cati</i> ou <i>T. canis</i>	79

SUMÁRIO

Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Toxocara canis</i> e <i>T. cati</i>	15
1.2 Ciclo de Vida	15
1.3 Toxocaríase humana	16
1.4 Alteração de comportamento	19
1.5 Labirinto em cruz elevado	21
1.6 Atividade motora em campo aberto	22
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Obtenção dos animais	29
4.2 Obtenção dos adultos de <i>T. canis</i> e <i>T. cati</i>	29
4.3 Obtenção dos ovos de <i>Toxocara</i> spp para cultura	30
4.4 Infecção dos animais para obtenção do Padrão de migração de larvas de <i>T. cati</i> em <i>R. norvegicus</i>	31
4.5 Infecção dos animais para avaliação da força muscular e comportamento	32
4.6 Avaliação da força muscular	33
4.7 Avaliação do comportamento no labirinto em cruz elevado	34
4.8 Avaliação da atividade motora em campo aberto	36
4.9 Recuperação e quantificação de larvas	37
4.10 Análise estatística das variáveis	37
4.11 Ética animal	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Padrão de migração de larvas de <i>T. cati</i> em <i>R. norvegicus</i>	39
5.2 Força muscular – fêmeas	40
5.3 Força muscular – machos	40
5.4 Comportamento	41
5.4.1 Labirinto em cruz elevado – fêmeas	41
5.4.2 Labirinto em cruz elevado – machos	44
5.4.3 Movimentação espontânea em campo aberto – fêmeas	47
5.4.4 Movimentação espontânea em campo aberto – machos	50
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICES	75
ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Toxocara canis* e *T. cati*

Toxocara canis e *T. cati* são helmintos parasitos de cães e gatos, respectivamente. A distribuição destes parasitos é mundial, ocorrendo principalmente em países emergentes (Chieffi et al, 2009; Overgaauw, 1997).

A transmissão de *T. canis* para cães ocorre via ingestão dos ovos embrionados presentes no ambiente, pela predação de hospedeiros paratênicos, via transmamária e transplacentária e ingestão de L5 (larva de quinto estágio) pela fêmea na higienização de seus filhotes (Overgaauw, 1997; Queiroz e Chieffi, 2005). No caso da transmissão de *T. cati* para felídeos não se conhece ocorrência da via transplacentária nem da ingestão de L5 (Coati et al, 2004; Sprent, 1956)

1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Toxocara* spp. é complexo, pois após serem ingeridas pelo hospedeiro definitivo, as larvas migram do intestino para o sistema sanguíneo, passando para o fígado, coração e pulmões. Nos pulmões, as larvas podem seguir dois caminhos, dependendo principalmente da idade do hospedeiro e da ocorrência de infecções anteriores. No primeiro, que ocorre principalmente em cães filhotes, conhecido como migração traqueal, as larvas penetram nos alvéolos pulmonares, sobem a árvore brônquica, chegam até a faringe e são deglutidas voltando para o intestino tornando-se machos e fêmeas adultos e consequentemente eliminando mais ovos. No segundo caso, conhecido como migração somática, as larvas não conseguem penetrar os alvéolos, devido à proteção adquirida pelo hospedeiro em infecção prévia. Neste caso, as larvas migram para outros órgãos e tecidos,

permanecendo em estado de latência e podem sobreviver por um longo período. Além disso, as larvas presentes na musculatura das fêmeas prenhes são estimuladas a migrar para o útero e glândulas mamárias, o que facilita a transmissão vertical desse parasito (Mattos-Junior, 1999; Sprent, 1956; Urquhart et al, 1990).

A ocorrência de toxocaríase em seu hospedeiro definitivo é mais frequente em animais jovens, sendo que em cães adultos existe a proteção adquirida pelo sistema imune durante a fase juvenil. Além disso, os filhotes estão mais expostos aos meios de transmissão, principalmente a transmissão transplacentária, que ocorre somente no caso de *T. canis* e transmamária, que ocorre em ambos os casos (Magnaival et al, 2001; Sprent, 1956).

Outros animais, inclusive o ser humano, podem infectar-se com estes ascarídeos, porém não haverá desenvolvimento de adultos no intestino. Neste caso as larvas migram para os tecidos permanecendo em estado de latência, podendo sobreviver por um longo período. Contudo, há relatos na literatura de adultos e crianças albergando exemplares adultos de *T. cati* e *T. canis* em seu intestino (Eberhard e Alfano, 1998; Wiseman e Lovel, 1969), provavelmente em decorrência de infecção acidental por L5.

1.3 Toxocaríase humana

A infecção humana pode ocorrer por vários mecanismos, tais como: ingestão acidental de ovos contendo larva de terceiro estágio (L3) presentes no ambiente, ingestão de carne ou vísceras cruas ou mal cozidas de hospedeiros paratênicos que alberguem larvas de terceiro estágio em seus tecidos. Crianças entre 2 e 6 anos são mais acometidas clinicamente por *Toxocara* spp., porém é crescente o relato de

acometimento de adultos (Chieffi et al, 2009; Magnaval et al, 2001; Overgaauw, 1997; Queiroz e Chieffi, 2005; Smith et al, 2009).

A toxocaríase é uma importante zoonose causada pela migração de larvas de *Toxocara* spp. nos tecidos e órgãos de seres humanos, podendo ocasionar três tipos de síndromes: Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Ocular (LMO) e Toxocaríase Oculta (TO). O diagnóstico é confirmado pela associação dos níveis de eosinófilos no sangue e sorologia positiva, entretanto é difícil estabelecer se trata-se de infecção crônica ou aguda (Dziemian et al, 2008; Magnaval et al, 2001; Queiroz e Chieffi, 2005).

A toxocaríase humana tende a ser assintomática e autolimitante, dispensando tratamento. Porém, para casos sintomáticos da infecção, existem medicamentos disponíveis para amenizar a gravidade da doença. Além disso, a escolha da droga dependerá de diversos fatores, incluindo a disponibilidade do medicamento, bem como a experiência no tratamento da toxocaríase (Caumes, 2003; Schantz, 1989).

Dentre as drogas antiparasitárias disponíveis para o tratamento da toxocaríase, somente os derivados benzimidazólicos (albendazol, mebendazol e tiabendazol) e diethylcarbamazina tem sido testados em estudos de caso controle (Caumes, 2003; Lescano et al, 2005).

Albendazol é a droga mais comum no tratamento da toxocaríase e apresenta pouco efeito colateral, embora outros compostos benzimidazólicos tivessem mostrado alguma eficácia. Em um estudo experimental comparando o efeito de mebendazol, tiabendazol e ivermectina na recuperação de larvas de *T. canis*, pode-se notar que a quantidade de larvas recuperadas dos animais tratados foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle, porém ao se considerar a quantidade de larvas recuperadas entre os grupos tratados, não se

obteve diferença significativa, caracterizando a similaridade da ação entre as drogas utilizadas (Lescano et al, 2005).

Medidas de educação sanitária e orientação aos proprietários de cães e gatos são fundamentais para a profilaxia e controle da toxocaríase humana. Existe forte correlação entre soropositivos para *Toxocara* e o convívio com cães e gatos, porém essa correlação é maior entre indivíduos com histórico de pica, principalmente geofagia. O fato de se ter animais em casa não implica na infecção daqueles que convivem com eles. O fator principal na transmissão, nesse caso, é a higienização do local onde estes animais vivem, pois os ovos eliminados em suas fezes necessitam de um período fora do hospedeiro para se tornarem infectantes. Esse período leva em média 28 a 30 dias, com condições ambientais favoráveis de umidade, temperatura, luminosidade e oxigenação (Lescano et al, 1998; Overgaauw, 1997).

Outro fator de relevância é a manutenção de bancos de areia disponíveis em creches e parques públicos. É importante promover a restrição de animais com cercas no local e os bancos de areia devem ser cobertos com lona para evitar defecação por gatos, uma vez que revolver a areia ou fazer a sua troca periódica não são medidas suficientes para eliminar a transmissão. Além disso, se faz necessário o controle das parasitoses gastrointestinais de cães e gatos com anti-helmínticos adequados, controle da população de animais errantes pelos Órgãos Públicos e educação em saúde da população (Smith et al, 2009).

O padrão de migração de larvas de *T.canis* em animais de experimentação está bem definido, e tem mostrado predileção do parasito pelo sistema nervoso central (SNC) (Abo-Shehada e Herbert, 1984; Bardón et al, 1994; Guillén et al, 1990;

Lescano et al, 2004). No entanto, o comportamento de larvas de *T. cati* em ratos ainda não é bem conhecido.

Fisher (2003) enfatiza a necessidade de mais estudos sobre o comportamento de *T. cati* em seus hospedeiros, pois a maioria dos trabalhos cita somente *T. canis* como problema de saúde pública. Além disso, existe a necessidade de padronizar diagnósticos laboratoriais, que diferenciem essas espécies o que auxiliaria nas pesquisas epidemiológicas.

1.4 Alteração de comportamento

A ideia de que parasitos alteram o comportamento de seus hospedeiros com o intuito de facilitar sua disseminação tem sido estudada por vários pesquisadores (Berday et al, 2000; Biron et al, 2005; Burright et al, 1982; Chieffi et al, 2010; Chieffi et al, 2009; Cox e Holland 2001; Cox e Holland 1998; Donovan e Burright 1987; Hay et al, 1986; Havlicek et al, 2001; Lamberton et al, 2008; Lion et al, 2006; Poulin 2000; Poulin 1995; Skallová et al, 2006; Seppälä & Valtonen 2004; Thomas et al 2003; Thomas et al, 2002; Vyas et al, 2007; Webster 2007).

Segundo Biron et al, (2005) está bem estabelecido que parasitos de todos os tipos modificam o comportamento de seus hospedeiros de maneira que parece melhorar as chances de completar seu ciclo de vida. Os mesmos autores afirmam ainda que, do ponto de vista evolutivo, estas alterações comportamentais são vistas como uma atraente ilustração do fenótipo estendido, segundo o qual genes em um organismo têm efeitos fenotípicos em outro.

Existem na literatura exemplos clássicos de alteração de comportamento em insetos e moluscos parasitados por helmintos. É o caso de *Dicrocoelium*

dendriticum, um parasito que tem como hospedeiro definitivo ovelhas e hospedeiro intermediário formigas. As formigas, quando parasitadas, são “influenciadas” a subir na parte superior das gramíneas, o que facilitaria a ingestão delas por ovelhas, fechando o ciclo do parasito. *Leucochloridium* é outro parasito digenético que altera a forma e coloração dos tentáculos de moluscos, seus hospedeiros intermediários. Além disso, os moluscos parasitados preferem ficar na parte alta da vegetação, tornando-se visíveis para pássaros, hospedeiros definitivos do parasito (Poulin, 1995; Poulin, 2005).

Outro parasito, *Paragordius tricuspidatus*, conhecido popularmente como *hairworm*, tem parte da sua vida no ambiente aquático – fase adulta reprodutiva - e parte dentro de gafanhotos terrestres – fase juvenil. Gafanhotos quando parasitados, por influência de um conjunto de proteínas liberado pelo parasito que atua no sistema nervoso, são induzidos à busca por ambientes aquáticos e a jogarem-se na água, após o quê o verme sai para este meio, que é o ambiente necessário para sua reprodução (Thomas et al, 2002; Thomas et al, 2003).

O fato das larvas de *T. canis* terem predileção pelo sistema nervoso central chamou a atenção de pesquisadores para a possibilidade deste parasito alterar o comportamento de seus hospedeiros. Com isso, muitos pesquisadores utilizando roedores infectados com *T. canis* observaram consideráveis evidências de alteração de comportamento exploratório e motor (Chieffi et al, 2010; Cox e Holland, 1998, 2001a,b; Dolinsky et al, 1981).

Alguns estudos relatam evidências de alterações no comportamento de camundongos infectados com larvas de *T. canis*, relacionando-as com a dose e carga parasitária no cérebro (Cox e Holland, 2001a,b). No entanto, antes de

chegarem ao SNC, as larvas passam pela musculatura do hospedeiro causando decréscimo na força muscular (Chieffi et al, 2009).

Estudos recentes mostram que, supostamente, humanos também podem sofrer algumas alterações comportamentais quando infectados por *Toxocara* spp. Scheid et al, (2008), relataram o caso de um homem de 45 anos que apresentou disfunção cognitiva e retenção urinária devido a infecção por *Toxocara* spp. Nicoletti et al, (2008), conduzindo um estudo de caso-controle na Itália, mostraram uma forte associação entre a sorologia positiva para *Toxocara* spp. e a epilepsia, sugerindo que a toxocaríase pode aumentar o risco desta doença.

Em estudo feito por Macura-Biegun et al, (1998), seres humanos apresentaram alterações musculares devido a infecção por *T. canis* e *Trichinella spiralis*. A presença das larvas na musculatura resultou na produção de anticorpos anti-músculo estriado, sugerindo a ocorrência de resposta auto-imune anti-musculatura.

Alterações comportamentais em roedores têm sido habitualmente estudadas com a utilização de labirinto em cruz elevado, arena ou gaiola para movimentação em campo aberto (Burright et al 1982; Chieffi et al, 2010; Dolinsk et al, 1981; Martinez et al, 2005; Nasello et al, 1998; Pellow et al, 1985; Silva et al, 1997; Walf e Frye, 2007).

1.5 Labirinto em Cruz Elevado

Labirinto em cruz elevado é o método mais utilizado na pesquisa da ansiedade em roedores e tem como base, respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos (Montgomery, 1955; Nasello, et al, 1998; Walf e Frye,

2007). Derivou do trabalho de Montgomery (1955) que descreveu pela primeira vez forte conflito de aproximação e esquiva de roedores, quando colocados em um aparato em forma de “Y”, e que os animais exploravam com maior frequência o braço fechado do aparato quando comparado com o braço aberto. O autor interpretou essa aversão ao braço aberto como sendo gerada pela neofobia e pela elevação do mesmo (Walf e Frye, 2007).

Estudos iniciais com o labirinto em cruz elevado foram realizados por Handley e Mithani (1984) na pesquisa dos efeitos de uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos em roedores. O aparelho era constituído de dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45x10 cm e situava-se 70 cm acima do solo. Os braços fechados apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que havia um aumento na proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas dos animais utilizando ansiolíticos como diazepam, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuíam esta proporção.

Além da utilização do labirinto em cruz elevado para verificar ansiedade em animais tratados com drogas ansiogênicas/ansiolíticas tem-se utilizado também para análise da alteração comportamental de animais experimentalmente infectados por parasitos (Chieffi et al, 2010; Skallová et al, 2006).

1.6 Atividade motora em campo aberto

Hall (1934) desenvolveu o campo aberto com o intuito de analisar a emocionalidade em roedores. O aparato inicial tinha forma circular, com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, fechado lateralmente com parede de madeira

de 0,45 m de altura. O procedimento consistia em confrontar o animal com um ambiente novo observando variáveis comportamentais, tais como: locomoção, erguer-se sobre as patas traseiras (*rearing*), auto-limpeza (*grooming*), eliminação de *pellets* fecais e tempo gasto na área central do aparato.

Vários autores relataram que os animais preferem permanecer na periferia do aparato e que ao se locomoverem mantinham sempre contato com as paredes, ou seja, apresentavam tigmotaxia (Carola et al, 2002; Lister, 1990, Prut e Belzung, 2003, Ramos et al, 1997, Treit et al, 1993).

A utilização deste modelo para avaliar a ansiedade de roedores tem sido proposta, levando em consideração que o aumento na deambulação e maior tempo de permanência na região central do aparato indicam uma redução na ansiedade (Choleris et al, 2001; Lister, 1990).

2 JUSTIFICATIVA

O impacto da infecção por *T. canis* no comportamento de mamíferos hospedeiros não habituais sugere que as reações imunopatológicas a este nematódeo podem ser uma causa de alterações no comportamento e um sintoma de infecção e que o histórico de exposição pode alterar reações a exposições subsequentes. *T. canis* pode alterar um amplo espectro do comportamento em camundongos, incluindo reatividade para o paladar e exploração do ambiente. Alteração no desempenho do aprendizado em camundongos e ratos também tem sido observada após a infecção com *T. canis* (Donovick & Burrigh, 1987). Porém, pouco se sabe sobre o comportamento migratório das larvas de *T. cati* e alteração comportamental de *Rattus norvegicus* infectados com este ascarídeo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

- Verificar a distribuição das larvas de *T. cati* em *R. norvegicus*, linhagem Wistar, experimentalmente infectados, bem como avaliar a força muscular e comportamento destes roedores, quando infectados por esse ascarídeo.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar as fases miotrópica e neurotrópica na infecção experimental de *R. norvegicus* com *T. cati*;
- Comparar atividade motora e ansiedade destes roedores experimentalmente infectados com *T. cati* ou *T. canis*, nas fases aguda e crônica da infecção.
- Verificar se há diminuição da força muscular de *R. norvegicus* infectados experimentalmente com *T. cati* ou *T. canis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos animais

Exemplares machos e fêmeas de *R. norvegicus*, linhagem Wistar, com idade aproximada entre 6 a 8 semanas foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram divididos por sexo em grupos com cinco ratos cada e mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 49x34x16cm com tampa em grade de ferro medindo aproximadamente 49x34cm, malha de 0,7cm, com comedouro embutido em V e duas divisórias basculantes separando-o do bebedouro. Para cada gaiola foram disponibilizados água e alimento *ad libitum*. As gaiolas eram inspecionadas diariamente e efetuava-se limpeza duas vezes por semana. A sala em que as gaiolas permaneceram depositadas estava equipada com controle de temperatura (19°C/23°C), exaustão de ar e dispositivo para promover alternância de períodos claros e escuros a cada 12 horas.

4.2 Obtenção dos adultos de *T. canis* e *T. cati*

Os vermes adultos de *T. canis* foram recuperados de cães errantes, naturalmente infectados, capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos/SP. Os vermes foram acondicionados em recipiente de vidro contendo solução salina em temperatura de 4°C até a data do processamento.

Para obtenção de *T. cati*, três gatos doados ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, com aproximadamente dois meses de idade, foram infectados com quinze mil ovos cada. Os ovos utilizados na infecção destes animais foram obtidos de cultura mantida no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Não se optou pela utilização destes

ovos no experimento, devido ao tempo de cultura que já ultrapassava um ano, condição esta que diminui a viabilidade das larvas (Lescano et al, 2004).

Os gatos foram encaminhados para o biotério do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e alojados em gaiolas metálicas com dimensões de 60x60x60cm, mantidas suspensas sobre bancada a 90cm do chão, mantendo-se um animal por gaiola por um período de aproximadamente 35 dias. Após esse período, as fezes dos animais foram coletadas e processadas utilizando a Técnica de Lutz ou Hoffman, Pons e Janer (De Carli, 2007) para pesquisa de ovos de *T. cati*. Confirmada a presença de ovos, os animais foram tratados com Endal Plus® (comprimidos com Praziquantel 20,0 mg, Pamoato de Pirantel 230,0 mg), na dosagem de um comprimido para cada 4 kg de peso, conforme orientação do fabricante. Após o tratamento, as fezes dos animais foram coletadas e dissolvidas em água destilada e tamisadas para recuperação dos vermes adultos. Os vermes foram mantidos em recipientes separados por sexo e conservados em geladeira a 4°C em solução salina 0,85% até a data da recuperação dos ovos das fêmeas.

4.3 Obtenção dos ovos de *Toxocara* spp. para cultura

Para obtenção dos ovos de *Toxocara* spp. as fêmeas foram dissecadas em uma placa de Petri contendo água acidificada (pH 3), cortando-as no terço anterior do corpo e retirando os úteros que foram rompidos para permitir a liberação dos ovos, os quais eram coletados em um cálice de sedimentação. Uma vez abertas todas as fêmeas, os ovos foram concentrados por centrifugação a 1500 rpm em durante 5 minutos. Transferiu-se o sedimento com ovos para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, vedado com tampa de algodão, contendo aproximadamente 200 mL de Formalina 2%. O frasco foi acondicionado em estufa a 28°C durante

aproximadamente 30 dias, sendo que durante todo o período, o mesmo foi agitado manualmente duas vezes ao dia para garantir a oxigenação dos ovos e consequentemente favorecer o desenvolvimento das larvas até o terceiro estágio (Fig. 1).

Transcorrido o tempo necessário e, ao observar ao microscópio de luz com aumento de 40x a formação de larvas de terceiro estágio, procedeu-se a lavagem dos ovos com solução salina fisiológica por três vezes para remover a solução de formalina e dar início à infecção dos animais.

Figura 1 : Ovos larvado e infértil de *T. cati* de cultura *in vitro*.

Este procedimento foi utilizado tanto para obtenção de ovos larvados de *T. cati*, como de *T. canis*.

4.4 Infecção dos animais para obtenção do padrão de migração de larvas de *T. cati* em *R. norvegicus*

Foram utilizados 21 exemplares de *R. norvegicus*, linhagem Wistar, machos com idade aproximada de oito semanas. Cada animal recebeu 0,2µL de solução

salina fisiológica com aproximadamente 300 ovos larvados de *T. cati*, via oral. Para esse procedimento, utilizou-se uma agulha de gavagem para ratos. Nos dias 3, 5, 8, 10, 15, 30 e 60 após infecção, três animais foram submetidos a eutanásia para retirada do fígado, pulmões, rins, cérebro, olhos e lateral direita da musculatura. Cada órgão foi colocado em uma tela de náilon (malha 2mm) com tamanho variando de acordo com o órgão e mergulhado em recipiente contendo solução ácida (HCl 0,5%) a 37°C durante 24 horas. Decorrido o período necessário, os órgãos foram descartados e o conteúdo de cada recipiente foi transferido para tubos Falcon de 50 mL, devidamente identificados, e centrifugados a 1 500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado permanecendo apenas o sedimento para leitura e contagem das larvas em microscópio de luz com aumento de 40x (Xi e Jin, 1998).

4.5 Infecção dos animais para avaliação da força muscular e comportamento

Foram utilizados 50 exemplares de *R. norvegicus*, linhagem Wistar, fêmeas, com idade variável entre seis e oito semanas, e divididos em três grupos: *T. canis* – 20 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara canis*; *T. cati* – 20 ratos infectados com 300 ovos de *Toxocara cati* e controle – 10 ratos sem infecção. Todos os animais receberam uma marcação com solução saturada de Ácido Pícrico para permitir a diferenciação entre os indivíduos de cada gaiola. O mesmo procedimento foi efetuado em 50 exemplares machos de *R. norvegicus* submetidos às mesmas condições.

Para quantificação dos ovos, calculou-se a média da contagem de três lâminas contendo 50µL do conteúdo do tubo com a cultura de ovos e ajustou-se a quantidade de 300 ovos em 0,2mL para cada animal (Lescano et al, 2004).

A infecção dos animais foi efetuada por via oral, por intermédio de agulha de gavagem para ratos e nos animais do grupo controle foi administrada, pela mesma via, quantidade equivalente de solução fisiológica.

4.6 Avaliação da força muscular

Nos dias 5, 15 e 40 pós-infecção (dpi) por *T. canis* e *T. cati*, os animais dos grupos infectados e controle foram submetidos à avaliação para determinação da intensidade de força muscular nas patas dianteiras.

A avaliação da força muscular foi efetuada com emprego de aparelho especial ("*grip strength meter for rat*", catálogo nº 47105, produzido por Ugo Basile, *Biological Research Apparatus*, Comerio, Varese, Itália). O aparelho possui uma base com uma haste em forma de "T" ajustada a um transdutor de força que se liga a um amplificador de pico (Fig. 2). O animal foi colocado sobre a base em frente a haste e, ao ser puxado pela cauda, agarrou-se à haste com as patas dianteiras puxando-a até gerar fadiga muscular e consequentemente liberação da mesma. O pico de força foi captado pelo aparelho e apresentado no visor de cristal líquido em gramas. Este procedimento foi feito com três repetições para cada grupo, obtendo-se a média da força muscular, obedecendo à sequência da primeira medida. Na mesma ocasião, os animais de cada grupo foram pesados individualmente para averiguar se, no período da infecção, houve diminuição da massa corporal, o que poderia influenciar na força dos animais.

Figura 2: Aparelho *Grip strength meter for rat*

4.7 Avaliação do comportamento no Labirinto em Cruz Elevado

Nos dias 40 e 70 pós-infecção os animais foram submetidos à avaliação das variáveis comportamentais no labirinto em cruz elevado, para determinação dos níveis de ansiedade, empregando-se técnica descrita por Pellow et al, (1985 e 1986).

O laboratório onde foram executados os testes comportamentais era constituído de uma ante-sala com bancada para disposição das gaiolas e duas salas para procedimento dos testes. O nível de iluminação das salas era similar ao do biotério. As portas estavam equipadas com perfil de borracha para minimizar ruídos externos.

O labirinto em cruz elevado utilizado foi construído a partir do descrito por Handley e Mithani (1984), com algumas modificações. O aparato é constituído de madeira de cor branca, com elevação de 50 cm do solo. Possui dois braços abertos de 50x10 cm cruzados perpendicularmente por dois braços da mesma dimensão fechados por parede de madeira de 40 cm de altura com a parte superior aberta. O

ponto onde os braços se cruzam é formado por uma arena central de 10x10 cm (Fig. 3).

Figura 3: Labirinto em Cruz Elevado

Uma hora antes do procedimento, os animais foram transferidos para a antecâmara do laboratório para ambientação. Após este período, os animais foram individualmente levados à sala onde estava posicionado o aparelho e colocados na intersecção dos braços do labirinto, com a cabeça voltada para o braço aberto, em sentido oposto ao avaliador. Cada animal permaneceu no aparelho por 5 minutos. Durante este tempo, foram observadas as variáveis: tempo de permanência dos animais nos braços abertos, fechados e no centro. Frequência de entrada nos braços abertos e fechados, fundo dos braços abertos e dos braços fechados e frequência de mergulhar a cabeça no braço aberto (*head dipping*). Nos intervalos entre cada animal, o aparato foi higienizado com Etanol 5%.

Tomou-se como padrão de entrada nos braços abertos e fechados, quando o animal estivesse com as quatro patas posicionadas nos respectivos braços.

4.8 Avaliação da atividade motora em campo aberto

A atividade motora, outro parâmetro comportamental, foi medida por meio da técnica de determinação de atividade motora em campo aberto, conforme descrição de Guaraldo et al, (2000), Nasello et al, (1998) e Silva et al, (1997), utilizando aparelho Basile 47420 *Multiple Activity Cage* (Fig. 4).

Figura 4: Gaiola para movimentação espontânea em campo aberto (*Cage Activity*)

Para todos os procedimentos de análise comportamental, os animais foram retirados do biotério e colocados na ante-sala do laboratório durante uma hora para ambientação.

Após período de ambientação, os animais foram individualmente introduzidos na parte central da caixa acrílica do aparato por 5 minutos para observação e registro das variáveis de comportamento: movimentos horizontais e verticais, tempo de *Grooming* (comportamento de auto limpeza), quantidade de *pellets* fecais eliminados e tempo de imobilidade.

Movimentos horizontais e verticais dos animais eram registrados pelo aparelho por meio de quatro barras com sistema de sensor infra-vermelho dispostas nas laterais da caixa acrílica. As outras variáveis foram manualmente medidas.

4.9 Recuperação e quantificação de larvas

No final do experimento, os animais foram submetidos a eutanásia e efetuou-se digestão da musculatura e sistema nervoso central em solução ácida de todos os animais, para confirmação da infecção e avaliação da carga parasitária.

4.10 Análise estatística das variáveis

Para análise estatística das variáveis: peso, força muscular e comportamento, efetuaram-se testes de variância de medidas repetidas, análise de variância, e Kruskal-Wallis utilizando o programa SPSS versão 17.

4.11 Ética animal

O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 010/06 e 003/08 (Anexos A e B).

5 RESULTADOS

5.1 Padrão de migração de larvas de *T. cati* em *R. norvegicus*

Larvas de *T. cati* foram recuperadas em todos os órgãos e carcaça de *R. norvegicus* durante todo o período do experimento, com menor quantidade observada nos rins, olhos e cérebro. Encontrou-se maior concentração de larvas na musculatura e fígado, com média mais elevada nos dias 15 e 60 e 3 e 5 pós-infecção, respectivamente. No fígado, houve diminuição gradual no número médio de larvas até o 10º dpi e em seguida notou-se estabilização. Nos rins, a média de larvas também foi maior no 3º dpi, diminuindo ao longo do experimento.

A tabela 1 mostra a média e desvio padrão de larvas de *T. cati* recuperadas dos diversos órgãos e musculatura de *R. norvegicus* após infecção experimental com 300 ovos.

Tabela 1 – Média das larvas de *T. cati* recuperadas de órgãos e tecidos de *R. norvegicus* experimentalmente infectados em diferentes dias pós-infecção.

Grupo n=21	*DPI	Carcaça	Fígado	Pulmões	Rins	Olhos	Cérebro
1	3	67,3(±25,1)	86,3(±17,6)	77,3(±30,7)	12,0(±3,4)	0,3(±0,5)	0,0(±0,0)
2	5	154,0(±80,6)	29,6(±16,1)	74,0(±29,4)	11,6(±6,0)	0,3(±0,5)	3,3(±2,8)
3	8	115,3(±97,8)	4,0(±2,6)	13,6(±5,0)	1,3(±1,5)	0,3(±0,5)	0,6(±1,1)
4	10	54,6(±4,1)	0,3(±0,5)	12,0(±17,3)	0,3(±0,5)	0,0(±0,0)	1,0(±1,0)
5	15	236,6(±72,3)	2,6(±3,7)	40,0(±32,0)	1,6(±1,1)	0,0(±0,0)	1,6(±1,5)
6	30	176,6(±75,7)	2,3(±0,5)	14,6(±14,1)	0,0(±0,0)	0,3(±0,5)	3,3(±3,5)
7	60	290,3(±9,2)	2,3(±0,5)	44,0(10,1)	0,3(±0,5)	0,0(±0,0)	0,0(±0,0)

*DPI= dia pós-infecção

Os dados obtidos na primeira fase do presente trabalho foram publicados na revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Santos et al 2009)(Anexo, C).

5.2 Força Muscular - fêmeas

No 5º e 15º dias pós-infecção observou-se diminuição da força muscular das patas dianteiras com diferença significativa entre os valores de força nos ratos infectados por *T. canis* e *T. cati* quando comparados com o grupo controle; essa diferença, porém, não foi observada entre os animais dos grupos infectados. No 42º dia pós-infecção, todos os grupos apresentaram diferenças significantes entre si, com maior destaque para o grupo infectado com *T. cati* (Tabela 2).

Não houve diferença no peso dos animais infectados quando comparados com os do grupo controle.

Tabela 2 – Valor médio da força muscular e do peso de *R. norvegicus* fêmeas aos 5, 15 e 42 dias após infecção por *T. cati* ou *T. canis*.

Grupo	Força muscular (g)	Peso(g)	Força muscular (g)	Peso(g)	Força muscular (g)	Peso(g)
	5 dias		15 dias		42 dias	
Controle n=8	471,0(58,5)	253,1(±20,6)	461,5(±94,6)	264,5(±23,2)	356,0(43,2)	277,5(±22,6)
<i>T. canis</i> n=10	348,8(±100,4)*	252,4(±34,8)	319,1(±98,7)*	244,3(±13,7)	216,2(74,4)*+	275,5(±16,8)
<i>T. cati</i> n=10	368,3(±83,6)*	256,5(±24,1)	326,3(±111,9)*	253,3(±13,0)	162,7(28,1)*+	271,2(±15,0)

*Diferença significativa comparado ao grupo controle, + diferença significativa entre os grupos infectados

5.3 Força Muscular - machos

Os machos apresentaram diminuição estatisticamente significativa entre todos os grupos durante todo o experimento com maior decréscimo da força muscular nos animais do grupo infectado com *T. cati*.

Nos três períodos do experimento não se observou diferença estatisticamente significativa entre o peso dos animais de todos os grupos.

A tabela 3 resume os dados da força muscular das patas dianteiras e peso obtidos dos animais nos três períodos avaliados.

Tabela 3 – Valor médio da força muscular e do peso de *R. norvegicus* machos aos 5, 15 e 42 dias após infecção por *T. cati* ou *T. canis*.

Grupo	Força muscular (g)	Peso(g)	Força muscular (g)	Peso(g)	Força muscular (g)	Peso(g)
	5 dias		15 dias		42 dias	
Controle n=10	249,1(±21,9)	188,3(±12,6)	285,9(±47,9)	237,2(±21,4)	561,5(±56,5)	365,0(±28,0)
<i>T. canis</i> n=20	114,7(±30,8)*	197,2(±19,1)	157,1(±30,2)*	236,4(±25,1)	402,5(±73,5)*	362,4(±34,2)
<i>T. cati</i> n=19	94,0(±21,2)*	199,8(±24,4)	120,3(±25,0)*	249,3(±26,7)	284,8(±66,8)*	347,0(±47,2)

*=p<0,05

5.4 Comportamento

5.4.1 Labirinto em Cruz Elevado - Fêmeas

A média e desvio padrão das variáveis de frequência de entrada nos braços aberto e fechado, fundo dos braços aberto e fechado, *head dipping* e tempo de permanência nos respectivos braços e no centro, das fêmeas de *R. norvegicus* aos 40 e 70 dias pós-infecção estão dispostas em forma de tabela no Apêndice A.

Aos 40 dias pós-infecção, os animais dos grupos *T. canis* e *T. cati* apresentaram maior frequência de entradas nos braços abertos quando comparados ao grupo controle. Na análise da frequência de entrada no fundo dos braços abertos os animais dos grupos infectados apresentaram menor frequência de entradas (fig.5). Para as variáveis de entrada nos braços fechados e no fundo dos mesmos,

os grupos *T. canis* e *T. cati* mostraram maior frequência. Analisando a variável *head dipping* observou-se que não houve diferença entre os grupos.

Figura 5— Média da frequência de entrada de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e *head dipping* no Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção.

Para as variáveis de tempo de permanência nos braços abertos, fechados e centro do labirinto em cruz elevado, os animais dos grupos infectados permaneceram mais tempo nos braços abertos, sendo que o grupo *T. canis* apresentou diferença significativa quando comparados ao grupo controle (fig.6).

Figura 6 – Média do tempo de permanência de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção.

Com 70 dpi, o grupo *T. cati* entrou com menor frequência nos braços abertos quando comparado aos grupos *T. canis* e controle. Em contrapartida, a frequência de entrada no fundo dos braços abertos foi maior para o grupo *T. canis*. A frequência de entradas nos braços fechados foi maior para o grupo *T. cati*. Para a variável entrada no fundo dos braços fechados, os grupos *T. canis* e *T. cati* apresentaram menor frequência quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença entre os grupos quando avaliada a variável *head dipping* (fig.7).

Figura 7 – Média da frequência de entrada de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e *head dipping* no Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção.

Aos 70 dias após infecção, o tempo de permanência nos braços abertos foi maior nos grupos infectados. *T. canis* apresentou maior tempo de permanência nos braços abertos e menor tempo nos braços fechados. O tempo de permanência no centro do labirinto em cruz elevado foi praticamente igual para todos os grupos (fig.8).

Figura 8 – Média do tempo de permanência de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção

5.4.2 Labirinto em Cruz Elevado - Machos

A média e desvio padrão das variáveis de frequência de entrada nos braços aberto e fechado, fundo dos braços aberto e fechado, *head dipping* e tempo de permanência nos respectivos braços e no centro, dos machos de *R. norvegicus* aos 40 e 70 dias pós-infecção estão dispostas em forma de tabela no Apêndice B.

Avaliando-se os machos no labirinto em cruz elevado aos 40 dpi, observou-se que os grupos *T. canis* e *T. cati* mostraram maior frequência de entrada nos braços abertos e no fundo dos braços abertos quando comparados ao grupo controle. Com relação a frequência de entrada nos braços fechados e no fundo dos mesmos, apenas o grupo *T. cati* apresentou menor frequência de entrada. Os animais infectados por *T. canis* não apresentaram *head dipping* durante o teste no labirinto em cruz elevado, o mesmo não ocorreu com o grupo *T. cati* que apresentou maior frequência entre os grupos (fig.9).

Figura 9 – Média da frequência de entrada de *R. norvegicus* machos no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e *head dipping* no Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção.

Quando observado o tempo de permanência nos braços abertos e fechados do labirinto em cruz elevado, observou-se que o grupo *T. cati* gastou mais tempo nos braços abertos e menos tempo nos braços fechados e no centro quando comparado aos grupos *T. canis* e controle (fig.10).

Figura 10 – Média do tempo de permanência de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 40 dias após infecção.

Aos 70 dias pós-infecção, os animais infectados por *T. cati* entraram com menor frequência nos braços abertos (fig.11), porém permaneceram mais tempo nos mesmos (fig.12). Apesar de não apresentar alteração na frequência de entrada nos braços abertos quando comparado ao grupo controle, o grupo *T. canis* permaneceu mais tempo nos braços abertos. Com relação à entrada nos braços fechados, observou-se que *T. canis* mostrou menor frequência de entradas quando comparado aos outros grupos, porém com maior tempo de permanência.

Figura 11 – Média da frequência de entrada de *R. norvegicus* machos no braço aberto (EBA), fundo do braço aberto (FBA), braço fechado (EBF), fundo do braço fechado (FBF) e *head dipping* no Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção.

Figura 12 – Média do tempo de permanência de *R. norvegicus* fêmeas no braço aberto (TBA), braço fechado (TBF) e no centro (TC) do Labirinto em Cruz Elevado com 70 dias após infecção.

5.4.3 Movimentação espontânea em campo aberto - fêmeas

Na avaliação das variáveis: frequência de movimentos horizontais e verticais, tempo de *grooming*, imobilidade e quantidade de *pellets* fecais eliminados das fêmeas no teste de atividade motora em campo aberto com 41 e 71 dias pós-infecção, pôde-se observar que não houve alterações estatisticamente significantes entre os grupos avaliados.

A figura 13 mostra que os animais dos grupos infectados aos 41 dias movimentam-se com maior frequência no teste de movimentação espontânea em campo aberto quando comparados com o grupo controle, porém quando avaliado o tempo de *grooming* (fig.14) os grupos têm comportamento similar. A quantidade média de *pellets* fecais eliminadas pelos animais foi menor nos grupos *T. canis* e *T. cati* (fig.15).

Figura 13 – Média dos movimentos vertical e horizontal de fêmeas de *R. norvegicus*, com 41 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 14 – Média da imobilidade e *grooming* de fêmeas de *R. norvegicus*, com 41 dias de infecção, avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 15 - Eliminação de *pellets* fecais de fêmeas de *R. norvegicus* após 41 dias de infecção por *T. canis* ou *T. cati* e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Aos 71 dias pós-infecção os animais apresentaram movimentos horizontais semelhantes entre si, porém a movimentação vertical foi mais frequente nos animais dos grupos *T. canis* e *T. cati*. Com relação ao tempo em que os animais permaneceram imóveis, *T. canis* apresentou maior tempo de imobilidade do que *T. cati* (fig.16). Além disso, os animais dos grupos infectados apresentaram menor tempo de *grooming* quando comparados ao grupo controle (fig.17). A eliminação de *pellets* fecais foi maior nos animais do grupo *T. canis* (fig.17).

Figura 16 – Média dos movimentos vertical e horizontal de fêmeas de *R. norvegicus*, com 71 dias de infecção e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 17 – Média da imobilidade e *grooming* de fêmeas de *R. norvegicus*, com 71 dias de infecção avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 18 - Eliminação de *pellets* fecais de fêmeas de *R. norvegicus* após 71 dias de infecção com *T. canis* ou *T. cati* e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

5.4.4 Movimentação espontânea em campo aberto - machos

Na avaliação da movimentação espontânea em campo aberto dos machos, os grupos infectados apresentaram movimentos horizontais com maior frequência quando comparados com o grupo controle. Para os movimentos verticais os grupos

apresentaram freqüências semelhantes (fig.19). Na avaliação do tempo de imobilidade os animais dos grupos *T. canis* e *T. cati* permaneceram menos tempo imóveis em comparação ao grupo controle. O tempo de *grooming* registrado foi semelhante entre os grupos (fig.20). Com relação à eliminação de pellets fecais, os animais infectados por *T. cati* apresentaram quantidade maior de fezes eliminadas (fig.21).

Figura 19 – Média dos movimentos vertical e horizontal de machos de *R. norvegicus*, com 41 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 20 – Média da imobilidade e *grooming* de machos de *R. norvegicus*, com 41 dias de infecção avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 21 - Eliminação de *pellets* fecais de machos de *R. norvegicus* após 41 dias de infecção com *T. canis* ou *T. cati* e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Quando avaliaram-se os grupos com 71 dias de infecção, o grupo *T. canis* apresentou maior frequência de movimentos horizontais e verticais quando comparados ao grupo controle (fig.22). As variáveis de tempo de imobilidade e *grooming* foram semelhantes entre os grupos (fig.23). A eliminação de *pellets* fecais foi menor no grupo *T. canis* (fig.24).

Figura 22 – Média dos movimentos vertical e horizontal de machos de *R. norvegicus*, com 71 dias de infecção no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 23 – Média da imobilidade e *grooming* de machos de *R. norvegicus*, com 71 dias de infecção avaliadas no teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

Figura 24 - Eliminação de *pellets* fecais de machos de *R. norvegicus* após 71 dias de infecção por *T. canis* ou *T. cati* e avaliadas com o teste de atividade motora espontânea em campo aberto.

6 DISCUSSÃO

O conjunto de conhecimentos disponível na literatura acerca da biologia, epidemiologia e fisiopatologia da infecção de hospedeiros naturais e/ou paratênicos por *T. cati*, quando comparado ao existente no caso da infecção por *T. canis* é bastante escasso (Fisher, 2003). Este trabalho pretende contribuir para melhor compreensão de alguns aspectos importantes na relação parasito-hospedeiro estabelecida entre *T. cati* e *R. norvegicus*, roedor que atua como hospedeiro paratênico deste ascarídeo.

O presente estudo analisou o padrão de migração de larvas de *T. cati*, alterações na força muscular e alterações comportamentais em *R. norvegicus* experimentalmente infectados com *T. cati* ou *T. canis*.

Na análise da migração das larvas de *T. cati* em *R. norvegicus* experimentalmente infectados, pode-se observar alta concentração de larvas na musculatura durante todo período do experimento com maior recuperação no 60º dia pós-infecção ($290,3 \pm 9,2$). No cérebro, as larvas foram recuperadas, em baixa concentração a partir do 5º dia pós-infecção até o 30º dia com médias de $3,3 \pm 2,8$ e $3,3 \pm 3,5$, respectivamente.

Esses dados mostraram algumas diferenças entre o comportamento migratório das larvas de *T. canis* e *T. cati*. A migração de larvas de *T. cati* para o cérebro é menos expressiva com recuperação média entre $0,6 \pm 1,1$ e $3,3 \pm 2,8$, fato já visto previamente em camundongos (Bardón et al, 1994; Dubey, 1968) e ocorreu entre o 5º dpi e o 30º dpi. No 60º dpi não foi recuperada nenhuma larva do cérebro.

Lescano et al, (2004) observaram que a fase miotrópica e neurotrópica de *T. canis* ocorreu entre o 5º e 15º dia pós-infecção, com maior recuperação nesses mesmos dias para fase miotrópica e 15º e 60º dia para fase neurotrópica. No mesmo trabalho pode-se observar homogeneidade na distribuição das larvas entre os órgãos, o que não aconteceu na infecção por *T. cati* que apresentou distribuição mais heterogênea com maior predileção pela musculatura.

Além disso, foram encontradas larvas nos olhos, logo no início deste experimento, confirmando os achados de Akao et al, (2000) em gerbilíneos experimentalmente infectados e a hipótese a respeito da importância da larva de *T. cati* na etiologia da larva migrans ocular (LMO) ou toxocaríase ocular. Entretanto, sob as condições deste experimento, uma única inoculação de ovos larvados de *T. cati* e somente 60 dias de observação, *R. norvegicus* não pode ser considerado um bom modelo experimental para a pesquisa da LMO, quando comparado a outras espécies de roedores (Alba-Hurtado et al, 2000; Alba-Hurtado et al, 2009; Havasiová-Reiterova et al, 1995;).

Segundo Fisher, (2003), apesar de existirem casos de infecção humana relatados na literatura, tem-se dado pouca importância a *T. cati* como agente de zoonose. A pesquisadora chama atenção, referindo dados da literatura, para o fato de que a larva migrans ocular pode estar mais relacionada com a infecção humana por *T. cati* do que por *T. canis*.

Os dados apresentados neste estudo reforçam a hipótese da importância da infecção de *R. norvegicus*, em condições naturais, pois sugerem o papel deste roedor como um potencial reservatório tanto para *T. canis* quanto para *T. cati* no ambiente. Além disso, alguns trabalhos mostram que hospedeiros paratênicos

albergando larvas de terceiro estágio de *T. canis*, apresentaram alterações comportamentais facilitando a sua predação por cães (Holland e Cox, 2001, Lescano et al, 2004; Reperant et al, 2009). Com base nos dados obtidos no presente experimento, em relação ao padrão de migração larvar de *T. cati* em *R. norvegicus*, é possível supor que hospedeiros paratênicos infectados com *T. cati* tenham seu comportamento alterado, tornando-se assim presas fáceis de seus predadores naturais.

Desde os anos 60 vem aumentando o interesse por parte de pesquisadores a respeito das mudanças comportamentais apresentadas por animais parasitados (Berdoy et al, 2000; Campbell e Fraser, 1961; Chieffi et al, 2009; Donovan e Burright, 1987; Havlíček et al, 2001; Holmes e Bethel, 1972; Keimer e Read, 1991). Poucas relações ecológicas são tão íntimas quanto aquelas entre parasitos e seus hospedeiros. A coexistência desses seres ao longo do tempo permitiu-lhes criar mecanismos de adaptação, de ambos os lados, que favorecessem a convivência entre eles (Poulin, 1995).

O fato é que não se conhece o mecanismo de ação que induz a alteração comportamental. Alguns autores afirmam que essas alterações são consequências de danos causados ao sistema nervoso, ou seja, efeito colateral da infecção (Hay et al., 1983; Hrdá et al., 2000). Já outros autores acreditam que esses parasitos são capazes de liberar substâncias que atuam como neurotransmissores que podem influenciar o comportamento do hospedeiro (Berdoy et al, 2000; Biron et al, 2005; Webster, 2007). De qualquer maneira, seja efeito colateral da infecção, seja por produção de neurotransmissores, é muitas vezes visível a alteração no comportamento de animais experimentalmente infectados.

Hamilton et al, (2008) avaliando a expressão de citocinas no cérebro de camundongos de duas linhagens diferentes (Balb/c e NIH) infectados por *T. canis*, concluíram que havia um aumento na expressão de IL-5, IL-10, INF γ e indução de óxido nítrico sintetase (iNOS) no cérebro dos camundongos, principalmente da linhagem Balb/c. Segundo os mesmos autores, as alterações no comportamento desses roedores, como por exemplo o comprometimento da memória, podem ter ligação com a produção dessas citocinas.

Em algumas relações parasito-hospedeiro, as modificações comportamentais são relativamente sutis, enquanto que em outras tornam-se bastante evidentes. Por exemplo, ratos infectados por *Toxoplasma gondii* mostraram um aumento em seu comportamento exploratório, elevando, de forma indireta, a probabilidade da predação pelo hospedeiro definitivo. (Berdoy et al, 1995a, 1995b).

Chieffi et al, (2009), observaram que *R. norvegicus*, infectados com quantidades diferentes de ovos larvados de *T. canis* (300 e 2000 ovos), apresentaram diminuição da força muscular nas patas dianteiras somente após o 30º dia da inoculação, porém a quantidade de ovos do inóculo, não teve influência na alteração da força destes roedores. Entretanto, quando analisadas três medidas efetuadas em seguida, percebeu-se que os animais que receberam 300 ovos apresentaram fadiga muscular mais intensa quando comparados com o grupo controle.

Neste estudo, avaliaram-se as alterações na força muscular de machos e fêmeas de *R. norvegicus* experimentalmente infectados por *T. canis* ou *T. cati* aos 5, 15 e 42 dias pós-infecção. Os dados obtidos mostraram que tanto machos como fêmeas desta espécie tiveram comprometimento da força muscular em todo o

período do experimento, sendo que o grupo de fêmeas infectadas com *T. cati* teve maior perda da força aos 42 dias pós-infecção, quando comparado com o grupo de fêmeas infectadas por *T. canis* e controle. Entretanto, entre os machos observou-se maior perda de força muscular durante os três momentos do experimento.

Essas diferenças na alteração da força muscular entre as duas espécies de parasitos aqui estudadas, provavelmente se deveu às diferenças observadas no padrão de migração das larvas desses parasitos neste roedor (Tabela 1). O fato de *T. cati* ter predileção pela musculatura do hospedeiro deve influenciar, de alguma maneira, em seu desempenho e, numa situação de fuga diante de um possível predador, animais parasitados principalmente com *T. cati* poderiam, devido às alterações na força muscular, ter menor chance de sobrevivência, o que favoreceria a transmissão do parasito.

Além do comportamento migratório das larvas, analisaram-se também alterações comportamentais nas fêmeas e machos dessa espécie de roedor infectados experimentalmente por *T. canis* ou *T. cati*.

Diversos autores observaram em camundongos infectados com *T. canis* alterações em seu comportamento exploratório e desempenho de aprendizagem (Burright et al, 1982; Dolinsk et al, 1981; Donovan e Burright, 1987; Hay et al, 1986).

Por outro lado, sabe-se que ratos têm predileção por explorar espaços fechados em comparação aos abertos e quando numa situação de escolha como, por exemplo, num labirinto em Y, preferem consistentemente os braços fechados (Ramos et al, 1997; Rodgers e Johnson, 1995, Rodgers et al, 1997).

No presente trabalho, embora não se tenha verificado diferença estatisticamente significativa na frequência de entrada nos braços abertos do labirinto em cruz elevado pelas fêmeas infectadas por *T. canis* com 40 dias de infecção, quando comparadas ao grupo controle, pode-se observar que essa diferença foi significativa em relação ao tempo de permanência deste grupo nos braços abertos. Todavia, aos 70 dias de infecção não se observou nenhuma diferença significativa. Trabalhando com animais infectados por *Toxoplasma gondii* Hrdá et al (2000) também encontraram alterações comportamentais transitórias.

Levando em consideração os índices de ansiedade: quanto maior a ansiedade, menor a percentagem de entrada nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos (Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986), pode-se sugerir que a infecção por *T. canis* teve efeito ansiolítico nesses animais. Entretanto, não se pode descartar a influência do ciclo estral no comportamento dos mesmos. Walf & Frye (2007) demonstraram que ratos ou camundongos fêmeas em fase diestro (baixos níveis de estradiol e progesterona) gastam menos tempo do que os machos nos braços abertos, ao passo que na fase de proestro (altos níveis de estradiol e progesterona) gastam mais tempo do que os machos. No entanto, discrepâncias entre os autores a este respeito têm sido observadas (Albebonetti e Farabollini, 1992; Louvart et al, 2005).

Quando se analisou o grupo dos ratos machos no labirinto em cruz elevado, não se observou diferença significativa no comportamento desses animais. No teste de movimentação espontânea em campo aberto, também não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos dos machos e entre o grupo das fêmeas.

O mesmo não foi observado por Chieffi et al, (2010) que encontraram diferenças significantes ao avaliarem o comportamento de fêmeas de *R. norvegicus* 30 dias após infecção com 2000 ovos larvados de *T. canis* no teste de movimentação espontânea em campo aberto. Essas diferenças podem estar relacionadas com a quantidade de ovos utilizados na infecção e com o tempo de infecção. Outro fator que pode ter influenciado relaciona-se aos equipamentos utilizados em cada experimento. Na avaliação do comportamento em campo aberto, utilizou-se arena circular, circundada com parede de madeira (Chieffi et al, 2010); o piso do aparato era dividido em 46 partes, por meio de círculos e segmentos radiais. No presente experimento empregou-se gaiola de atividade para análise de comportamento em campo aberto. Esta gaiola, ao contrário da arena, era constituída de paredes acrílicas transparentes e não havia divisões no piso. O fato do aparelho em acrílico permitir que animal tenha visão da área externa ao equipamento pode ter influenciado no seu estado de ansiedade. A ausência de marcações no piso, por sua vez, não permite estabelecer a frequência e o tempo com que o animal permaneceu no centro do aparato.

O estudo da alteração do comportamento decorrente da relação parasito-hospedeiro é de extrema importância, pois permite entender alguns dos mecanismos que estes parasitos utilizam para perpetuar sua espécie. O conhecimento desses mecanismos é necessário para a promoção de medidas de controle e prevenção de doenças relacionadas a infecções parasitárias.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. Larvas de terceiro estágio de *T. cati* apresentam em hospedeiros paratênicos comportamento migratório diferente do observado em larvas de *T. canis*, com predileção por localização na musculatura estriada.
2. Exemplares de *R. norvegicus*, independente do sexo, apresentaram diminuição da força muscular nas patas dianteiras de forma mais acentuada quando infectados por larvas de *T. cati*, do que quando a infecção foi causada por larvas de *T. canis*.
3. Fêmeas de *R. norvegicus* infectadas por larvas de *T. canis* revelaram alterações de comportamento permanecendo mais tempo em condições de exposição em campo aberto. O mesmo não se verificou entre fêmeas de *R. norvegicus* infectadas por larvas de *T. cati* ou entre roedores machos infectados por ambos os ascarídeos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abo-Shehadeh MN, Herbert IV. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. Vet. Parasitol. 1984;17:75-83
- Akao N, Takayanagi TH, Suzyki R, Tsukidate S, Fujita K. Ocular larva migrans caused by *Toxocara cati* in mongolian gerbils and a comparison of ophthalmologic findings with those produced by *T. canis*. J. Parasitol. 2000;86:1133-5.
- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA, Valdivia-Anda G, Tórtora JL, Ortega-Pierres MG. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Exp Parasitol. 2009;122:1-5.
- Alba-Hurtado F, Tórtora P, Tsutsumi V, Ortega-Pierres MG. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbil. Int J Parasitol. 2000;30:143-7.
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. J. Helminth. 1994;68:359-60.
- Barnard CJ, Behnke JM. Parasitism and host behaviour. London: Taylor and Francis;1990.
- Berdoy M, Smith P, MacDonald DW. Stability of social status in wild rats: age and the role of settled dominance. Behaviour. 1995a;132:193-212.
- Berdoy M, Webster JP, Macdonald DW. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proc Biol Sci. 2000;267:1591-4.
- Berdoy M, Webster JP, MacDonald DW. Parasite-altered behavior: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. Parasitology. 1995b;111:403-9.

Biron DG, Marché L, Ponton F, Loxdale HD, Galéotti N, Renault L, et al. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proc Biol Sci.* 2005;272:2117-26.

Burright RG, Donovan PJ, Dolinsky Z, Hurd Y. Behavioral changes in mice infected with *Toxocara canis*. *J Toxicol Environm Hlth.* 1982; 10:621-6.

Campbell DJ, Fraser AF. A note on animal behaviour as a factor in parasitism. *Can Vet J.* 1961;2:414-5.

Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002;134:49-57.

Caumes E. Treatment of cutaneous larva migrans and *Toxocara* infection. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17:213-6.

Chieffi PP, Aquino RTR, Pasqualotti MA, Ribeiro MCSA, Nasello AG. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis* larvae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52:243-6.

Chieffi PP, Aquino RTR, Paschoalotti MA, Ribeiro MC, Nasello AG. Muscular strength decrease in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51:73-5.

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

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25:235-60.

Coati N, Schnieder T, Epe C. Vertical transmission of *Toxocara cati* Schrank 1788 (Anisakidae) in the cat. *Parasitol Res.* 2004;92:142-6.

Cox DM, Holland CV. The influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. *J. Helminth.* 2001a;75:23-32.

Cox DM, Holland CV. The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology.* 1998;116:579-94.

Cox DM, Holland CV. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *J Helminth.* 2001b;75:33-41.

De Carli GA. Exames macroscópico e microscópico da amostra fecal fresco e preservada. In: De Carli, GA. *Parasitologia Clínica – Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas.* São Paulo: Atheneu; 2007. p. 29-82.

Dielenberg RA, McGregor IA. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25:597-609.

Dolinsky ZS, Burrigh RG, Donovan PJ, Glickman LT, Babish J, Summer B, et al. Behavioural effects of lead and *Toxocara canis* in mice. *Science.* 1981;213:1142-4.

Donovick PJ, Burrigh RG. The consequences of parasitic infection for the behavior of the mammalian host. *Environ Health Perspect.* 1987;73:247-50.

Dubey JP. Migration of *Toxocara cati* larvae in mice. *Trop geogr Med.* 1968;20:172-6.

Dziemian E, Arnowska H, Kolodziej-Sobocińska M, Machnicka B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. *Parasite Immunol.* 2008;30:187-90.

Eberhard ML, Alfano E. Adult *Toxocara cati* infections in U.S. Children: Report of four cases. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:404-6.

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

Good B, Holland CV, Stafford P. The influence of inoculum size and time post-infection on the number and position of *Toxocara canis* larvae recovered from the brains of outbred CD1 mice. *J Helminthol.* 2001;75:175-81.

Guaraldo L, Chagas DA, Konno AC, Kom GP, Pfiffer T, Nasello AG. Hydroalcoholic extract and fractions of *Davilla rugosa* Poiret: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behavior. *J Ethnopharm.* 2000;72:61-7.

Guillén J, Bardon R, Dominguez P, Del-Hoyo C. Migración larvaria de *Toxocara canis* y respuesta eosinofílica en las cepas murina BALB/c y C57BL/10. *Rev Iber Parasit.* 1990;50:289-99.

Hall, C.S., Emotional behavior in the rat. I. defecation and urination as measures of individual differences in emotionality, *J. Comp. Psychol.*, 18 (1934) 385-403.

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

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1984;327:1-5.

Havasiová-Reiterová K, Tomasovicová O, Dubinský P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res.*1995;81:13-7.

Havlíček J, Gašová Z, Smith AP, Zvára KJ, Flegr J. Decrease of psychomotor performance in subjects with latent “asymptomatic” toxoplasmosis. *Parasitology.* 2001;122:515–20.

Hay J, Arnott M, Aitken PP, Kendall AT. Experimental toxocariasis and hyperactivity in mice. *Z Parasitenkd.* 1986;72:115-20.

Hay J, Hutchison WM, Aitken PP, Graham DI. The effect of congenital and adult-acquired *Toxoplasma* infections on activity and responsiveness to novel stimulation in mice. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983;77:483-95.

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

Holmes JC, Bethel WM. Modification of intermediate host behavior by parasites. In: Canning EU, Wright CA, editors. *Behavioural aspects of parasite transmission.* London: Academic Press, 1972. p.123-49.

Hrdá S, Votýpka J, Kodym P, Flegr J. Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral change in mice. *J Parasitol.* 2000;86:657-63.

Keymer AE, Read AF. Behavioural ecology: the impact of parasitism. In: Toft CA, Aeschlimann A, Bolis L, editors. *Parasite-host associations: coexistence or conflict?* Oxford: University Press; 1991. p. 37-61.

Lamberton PHL, Donnelly CA, Webster JP. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behavior to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology.* 2008;135:1143-50.

Lescano SAZ, Chieffi PP, Peres BA, Mello EO, Velarde CN, Salinas AA, et al. Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. in the urban area of Lima, Peru. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;40:201-2.

Lescano SAZ, Chieffi PP, Amato-Neto V, Ikai DK, Ribeiro MCSA. Anti-helmíntico na toxocaríase experimental: efeito na recuperação de larvas de *Toxocara canis* e na resposta humoral. J Bras Patol Med Lab. 2005;41:21-4.

Lescano SAZ, Queiroz ML, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99:627-8.

Lion S, van-Baalen M, Wilson WG. The evolution of parasite manipulation of host dispersal. Proc R Soc B. 2006;273:1063-71.

Lister G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. Pharmac Ther. 1990; 46:321-40.

Martinez R, Garcia AMB, Morato S. Papel da luminosidade do biotério no comportamento do rato no labirinto em cruz elevado. Estud Psicol (Natal). 2005;10:239-45.

Macura-Biegun A, Pituch-Noworolska A, Rewicka M, Mrozewicz B, Noworolski J. Antistriational antibodies during *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* infection. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1998;21:101-6.

Magnaval JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. Korean J Parasitol. 2001;39:1-11.

Mattos-Junior DG. Manual de helmintoses comuns em cães. Niteroi: Universidade Federal Fluminense; 1999. p.34-46.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1955;48:254-60.

Nasello AG, Machado C, Bastos JF, Felício LF. Sudden dark induces a high activity-low anxiety state in male and female rats. *Physiol Behav*. 1998; 63:451-4.

Nicoletti A, Sofia V, Mantella A, Vitale G, Contrafatto D, Sorbello V, et al. Epilepsy and toxocariasis: A case-control study in Italy. *Epilepsia*. 2008;49:594-9.

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

Overgaauw PAM. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Human toxocarosis. *Crit Rev Microbiol*. 1997;23:215-31.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14:149-67.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986; 24:525-9.

Poulin R. "Adaptative" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int J Parasitol*. 1995;25:1371-83.

Poulin R, Fredensborg BL, Hansen Ellen, Leung TLF. The true cost of host manipulation by parasites. *Behav Processes*. 2005;68:241-4.

Poulin R. Manipulation of host behaviour by parasites: a weakening paradigm? *Proc R Soc Lond B*. 2000; 267:787-92.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:3-33.

Queiroz ML, Chieffi PP. Síndrome de *larva migrans* visceral e *Toxocara canis*. *Arq. Med. Hosp. Fac. Cienc. Med. Santa Casa São Paulo.* 2005;50:117-20.

Ramos A., Berton O, Pierre M, Chauloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav. Brain Res.* 1997;85:57-69.

Reperant DH, Heggin D, Tanner I, Fischer C, Deplazes P. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. *Parasitology.* 2009;136:329-37.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:289-304.

Rodgers RJ, Johnson NJT. Factor Analysis of Spatiotemporal and Ethological Measures in the Murine Elevated Plus-Maze Test of Anxiety. *Pharmacol Biochem. Behav.* 1995;52:297-303.

Schantz P. *Toxocara larva migrans* now. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;4:21-34.

Scheid R, Jentsch RT, Schroeter ML. Cognitive dysfunction, urinary retention, and a lesion in the thalamus-beware of possible toxocariasis of the central nervous system. *Clin Neurol Neurosurg.* 2008;110:1054-7.

Seppälä O, Karvonen A, Valtonen ET. Parasite-induced change in host behavior and susceptibility to predation in an eye fluke-fish interaction. *Anim Behav.* 2004;68:257-63.

Silva MRP, Bernardi MM, Nasello AG, Felício LF. Influence of lactation on motor activity and elevated plus-maze behavior. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30:241-4.

Skallová A, Kodym P, Frynta D, Flegr J. The role of dopamine in *Toxoplasma*-induced behavioural alterations in mice: an ethological and ethopharmacological study. *Parasitology*. 2006;133:525-35.

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

Sprent JFA. The life history and development of *Toxocara cati* (Schrunk 1788) in the domestic cat. *Parasitology*. 1956;46:54-78.

Thomas F, Schimidt-Rhaesa A, Martin G, Manu C, Durand P, Renaud F. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial host?. *J Evol Biol*. 2002;15:356-61.

Thomas F, Ulitsky P, Augier R, Dusticier N, Samuel D, Strambi C, et al. Biochemical and histological changes in the brain of the cricket *Nemobius sylvestris* infected by the manipulative parasite *Paragordius tricuspidatus* (Nematomorpha). *Int J Parasitol*. 2003;33:435-43.

Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;44:463-9.

Urquhart GM, Armour J, Dunn AM, Jennings FW. *Parasitologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p.72-7.

Vyas A, Seon-Kyeong K, Giacomini N, Boothroyd JC, Sapolsky RM. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:6442-7.

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2:322-8.

Webster JP. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. Schizophr Bull. 2007;33:752-6.

Wiseman RA, Lovel TWI. Human infection with adult *Toxocara cati*. Br Med J. 1969;3:454-5.

Xi WG, Jin LZ. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. J. Helminthol. 1998;72:183-4.

APÊNDICES

Apêndice A

Tabela 4 – Média das variáveis de comportamento no labirinto em cruz elevado de *R. norvegicus* fêmeas aos 40 e 70 dias após infectados por *T. cati* ou *T. canis*.

Variáveis comportamentais	Controle (n=8)		<i>Toxocara canis</i> (n=19)		<i>Toxocara cati</i> (n=19)	
	40 dpi	70 dpi	40 dpi	70 dpi	40 dpi	70 dpi
Entrada nos braços abertos(f)	0,5(±0,7)	1,8(±1,6)	2,1(±2,1)	1,9(±1,4)	1,0(±1,1)	1,0(±0,9)
Fundo dos braços abertos(f)	0,5(±0,7)	0,3(±0,5)	0,2(±0,7)	0,6(±0,8)	0,1(±0,4)	0,3(±0,4)
Entrada nos braços fechados(f)	3,3(±1,9)	3,3(±2,7)	5,4(±3,9)	3,3(±2,4)	5,6(±2,8)	3,5(±2,5)
Fundo dos braços fechados(f)	3,2(±1,9)	3,0(±2,8)	4,4(±2,7)	2,7(±1,9)	5,0(±2,3)	2,6(±1,7)
Head dipping(f)	0,1(±0,3)	0,0(±0,0)	0,2(±0,4)	0,1(±0,3)	0,1(±0,3)	0,0(±0,0)
Tempo nos braços abertos(t)	13,8(±11,0)*	37,7(±30,3)	34,6(±26,3)*	98,4(±99,1)	23,2(±19,6)	54,3(±69,2)
Tempo nos braços fechados(t)	268,6(±19,7)	238,1(±48,6)	239,1(±46,8)	178,1(±101,9)	255,8(±28,8)	224,4(±71,1)
Tempo no centro(t)	19,5(±15,5)	24,1(±19,7)	23,0(±23,3)	23,4(±26,4)	21,1(±16,7)	21,2(±24,3)

* p<0,05; (t) = Tempo em segundos; (f) = frequência,

Apêndice B

Tabela 5 – Média das variáveis de comportamento no labirinto em cruz elevado de *R. norvegicus* machos aos 40 e 70 dias após infectados por *T. cati* ou *T. canis*.

Variáveis comportamentais	Controle (n=10)		<i>Toxocara canis</i> (n=15)		<i>Toxocara cati</i> (n=15)	
	40 dpi	70 dpi	40 dpi	70 dpi	40 dpi	70 dpi
Entrada nos braços abertos(f)	3,3(±2,9)	2,8(±3,2)	4,3(±2,7)	2,0(±2,2)	4,0(±4,7)	2,8(±2,6)
Fundo dos braços abertos(f)	0,2(±0,4)	0,0(±0,0)	0,8(±1,1)	0,5(±0,9)	1,2(±2,0)	0,1(±0,2)
Entrada nos braços fechados(f)	3,5(±2,6)	3,8(±3,5)	3,6(±1,8)	3,6(±3,5)	2,9(±2,1)	2,5(±1,7)
Fundo dos braços fechados(f)	4,0(±2,4)	2,0(±1,7)	4,1(±1,7)	2,4(±1,8)	3,2(±1,8)	2,0(±1,1)
Head dipping(f)	0,5(±1,0)	1,9(±2,1)	0,0(±0,0)	2,6(±2,3)	1,4(±2,1)	3,4(±3,1)
Tempo nos braços abertos(t)	44,1(±77,8)	7,6(±12,3)	43,9(±37,7)	33,1(±51,8)	64,3(±85,6)	42,8(±57,7)
Tempo nos braços fechados(t)	236,6(±79,1)	243,7(±88,4)	236,5(±45,8)	251,1(±60,1)	225,1(±88,3)	240,8(±57,8)
Tempo no centro(t)	19,3(±20,4)	48,7(±90,1)	19,5(±16,1)	15,7(±16,6)	10,5(±8,5)	16,9(±21,5)

(f) = frequência; (t) = tempo em segundos

Apêndice C

Tabela 6 – Média das variáveis de comportamento em campo aberto – Actômetro - de *R. norvegicus* fêmeas aos 41 e 71 dias após infectados por *T. cati* ou *T. canis*.

Variáveis comportamentais	Controle (n=8)		<i>Toxocara canis</i> (n=19)		<i>Toxocara cati</i> (n=19)	
	41 dpi	71 dpi	41 dpi	71 dpi	41 dpi	71 dpi
Movimento vertical(f)	71,7(±46,6)	79,75(±63,3)	147,3(±142,1)	97,5(±90,0)	96,3(±47,6)	69,4(±34,3)
Movimento horizontal(f)	540,0(±283,9)	549,7(±231,3)	688,6(±343,1)	540,2(±290,8)	663,0(±288,4)	514,7(±201,5)
Imobilidade(t)	106,8(±69,0)	63,2(±38,0)	57,0(±52,0)	77,2(±69,2)	61,2(±46,7)	53,2(±38,0)
Grooming(t)	29,2(±21,4)	39,8(±36,9)	30,3(±22,0)	21,2(±22,6)	32,4(±20,3)	24,0(±19,0)
Pelets fecais(u)	0,3(±0,5)	0,5(±0,7)	0,3(±0,9)	0,6(±1,7)	0,1(±0,5)	0,5(±1,1)

(f)=frequência; (t)=tempo em segundos; (u)=unidade

Apêndice D

Tabela 7 – Média das variáveis de comportamento em campo aberto – Actômetro - de *R. norvegicus* machos aos 41 e 71 dias após infectados por *T. cati* ou *T. canis*.

Variáveis comportamentais	Controle (n=10)		<i>Toxocara canis</i> (n=15)		<i>Toxocara cati</i> (n=15)	
	41 dpi	71 dpi	41 dpi	71 dpi	41 dpi	71 dpi
Movimento vertical(f)	100,5(±55,8)	98,5(±68,0)	96,0(±41,9)	127,4(±82,6)	100,6(±49,7)	91,0(±63,1)
Movimento horizontal(f)	422,9(±205,6)	350,1(±175,9)	568,0(±258,0)	391,0(±214,1)	481,0(±153,5)	318,0(±209,0)
Imobilidade(t)	187,1(±64,6)	169,9(±79,6)	158,1(±51,8)	167,2(67,2)	179,3(±46,5)	152,0(70,5)
Grooming(t)	45,4(±22,6)	27,7(±25,1)	33,6(±24,6)	33,0(±25,9)	42,2(±21,0)	31,0(±18,2)
Pelets fecais(u)	3,0(±2,9)	3,1(±3,3)	3,3(±3,4)	2,0(±2,7)	4,5(±3,0)	3,6(±3,0)

(f)=frequência; (t)=tempo; (u)=unidade

Anexo A - Carta de aprovação Comitê de Ética – Migração das larvas de *T. cati*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3066-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 21 de dezembro de 2006.

Ilma. Sra.

Dra. Susana A. Zevallos Lescano

Prezada Senhora:

Em reunião realizada na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (CEP-IMT) e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto catalogado sob **número 010/06** e intitulado “**Recuperação de larvas de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* em tecidos e órgãos de *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados**”, encaminhado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Coordenador do CEP-IMT

Anexo B - Carta de aprovação Comitê de Ética – Comportamento e força muscular

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 09 de abril de 2008.

Ilmo. Sr.
Sérgio Vieira dos Santos

Prezado Senhor:

Em reunião na presente data o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto de pesquisa, classificado sob número 003/08 e intitulado **“Alterações comportamentais em *Rattus norvegicus* experimentalmente infectados por *Toxocara cati* ou *T. canis*”**, encaminhado por Vossa Senhoria.

Atenciosamente

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi
Coordenador do CEP-IMT

Anexo C - Publicação parcial – Larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected *Rattus norvegicus* and analysis of the rat as potential reservoir for this ascarid.

Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(6): 933-934, September 2009 933

Larval recovery of *Toxocara cati* in experimentally infected *Rattus norvegicus* and analysis of the rat as potential reservoir for this ascarid

Sérgio V Santos^{1/*}, Susana Z Lescano¹, João M Castro², Pedro P Chieffi^{1,3}

¹Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (LIM 06), Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 500 2º andar, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil

²Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, Brasil ³Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

Toxocara cati is a common feline parasite transmitted by the ingestion of embryonated eggs, by the transmammary route or by predation of paratenic hosts harbouring third-stage larvae in their bodies. In the present study, the larval distribution of *T. cati* in tissues and organs of *Rattus norvegicus* experimentally infected with 300 embryonated eggs was analysed. Third-stage larvae were recovered from livers, lungs, kidneys, eyes, brains and carcasses of infected rats, following tissue digestion with HCl 0.5% for 24 h at 37°C. Some differences from the known larval distribution of *Toxocara canis* in the same rodent species were found.

Key words: *Toxocara cati* - larval distribution - *Rattus norvegicus* - paratenic hosts

Visceral larva migrans (VLM) is the result of prolonged tissue migration of nematode larvae in unusual hosts (Beaver et al. 1952). In human beings, the main etiological agents for this syndrome are either *Toxocara canis* or *Toxocara cati* larvae (Schantz 1989). *T. cati* is a common helminth parasite of cats and is closely related to *T. canis*, a roundworm that frequently infects dogs.

When compared to the frequency of known human cases of infection by *T. canis* larvae, few records implicating *T. cati* as causative agents of VLM have been published (Fisher 2003). As a consequence, while *T. canis* is recognised as a dangerous zoonosis agent, *T. cati* has had its importance neglected by sanitary authorities and even sometimes by health professionals (Fisher 2003). However, there are some records of human intestinal infection by adult *T. cati* (Sprent 1956, Dubey 1968, Fisher 2003) and human ocular involvement by *T. cati* larvae causing ocular larva migrans (OLM) (Sakai et al. 1998), as well as some cases of VLM (Fisher 2003). Sprent (1956) pointed out that the larvae of *T. cati* can infect and migrate into tissues of some types of invertebrates (earthworms and cockroaches) as well as in birds, mice, lambs, dogs and probably human beings; the adult stage is only found in cats and, in rare cases, humans.

Cats can become infected with *T. cati* by ingesting embryonated eggs found in contaminated soil or by predation of paratenic hosts - usually small rodents or birds containing live third-stage larvae in their tissues (Sprent 1956). Another means of transmission in cats is larval transmammary migration (Sprent 1956, Coat et al. 2004). Some behavioural changes were found in paratenic hosts

harbouring third-stage *T. canis* larvae, probably favouring predation by dogs (Cox & Holland 2001), but there are no records of the occurrence of similar behavioural changes in rodents infected by *T. cati*.

Rattus norvegicus has been recognised as a usual paratenic host for *T. canis* (Chieffi et al. 1981) and probably also for third-stage *T. cati* larvae. Although the larval distribution of *T. canis* in *R. norvegicus* has already been studied (Lescano et al. 2004), the larval distribution for *T. cati* has only been analysed in mice (Dubey 1968) and has shown some significant differences when compared to that found for *T. canis* in the same rodent (Bardón et al. 1994). The aim of the present study was to recover larvae from tissues and organs of experimentally infected *R. norvegicus*, in order to characterise the migration pattern of *T. cati* larvae in this rodent species.

Twenty-one male *R. norvegicus* (Wistar strain) rats, aged eight weeks, were orally infected with 300 embryonated *T. cati* eggs containing third-stage larvae (Araújo 1972). On days 3, 5, 8, 10, 15, 30 and 60 after inoculation, three rats were killed and larvae were recovered from the liver, lungs, kidneys, eyes, brain and carcass of each rat after digestion with HCl 0.5% for 24 h at 37°C. Following sedimentation, supernatant was poured into a tube and centrifuged for 2 min at 1,500 rpm; then, 2 mL of the pelleted sediment was collected and thoroughly mixed and 0.1 cm³ samples were completely analysed under a light microscope for larval counts (Wang & Luo 1998). The final result, shown in Table, is an average of the larval numbers of all animals within each group.

The experimental protocol was approved by the Research Ethical Committee of the Instituto de Medicina Tropical, São Paulo.

Analysing *T. canis* larval migration, Lescano et al. (2004) observed a higher concentration of larvae in the liver, lungs and kidneys within the first five days after inoculation. After the 15th day of infection, an increase

* Corresponding author: sergio.bio@usp.br

Received 6 March 2009

Accepted 3 August 2009

TABLE
Mean number of *Toxocara cati* larvae recovered in organs and tissues in *Rattus norvegicus* experimentally infected

Group number	Days after infection	Carcass (%)	Liver (%)	Lungs (%)	Kidneys (%)	Eyes (%)	Brain (%)
1	3	67.3 (22.43)	86.3 (28.76)	77.3 (25.76)	12.0 (4.0)	0.3 (0.1)	0 (0.0)
2	5	154.0 (51.33)	29.6 (9.86)	74.0 (24.66)	11.6 (3.86)	0.3 (0.1)	3.3 (1.1)
3	8	115.3 (38.43)	4.0 (1.33)	13.6 (4.53)	1.3 (0.43)	0.3 (0.1)	0.6 (0.2)
4	10	54.6 (18.2)	0.3 (0.1)	12.0 (4.0)	0.3 (0.1)	0 (0.0)	1.0 (0.33)
5	15	236.6 (78.86)	2.6 (0.86)	40.0 (13.33)	1.6 (0.53)	0 (0.0)	1.6 (0.53)
6	30	176.6 (58.88)	2.3 (0.76)	14.6 (4.86)	0 (0.0)	0.3 (0.1)	3.3 (1.1)
7	60	290.3 (96.76)	2.3 (0.76)	44.0 (14.66)	0.3 (0.1)	0 (0.0)	0 (0.0)

in larval recovery from the brain was noted, lasting up to the 30th day of observation. Larvae were found in the muscles from the fifty day of infection up to the end of the experiment. Some significant differences were observed in our study of *R. norvegicus* infected with *T. cati* larvae and the study of Lescano et al. (2004). In our study, for example, larval migration to the brain was less expressive - similar to that previously observed in mice (Bardón et al. 1994) - and occurred mainly on the 15th and the 30th days after inoculation. On the other hand, our report of the ocular migration of *T. cati* larvae occurring principally at the beginning of the this experiment confirms the findings of Akao et al. (2000) in experimentally infected gerbils and the hypothesis regarding the importance of *T. cati* larvae in the etiology of OLM. Under the conditions of our present experiment (a single inoculation of *T. cati* eggs and only 60 days of observation period), *R. norvegicus* does not seem to be the best model for OLM when compared to other rodent species (Havasiová-Reiterová et al. 1995, Alba-Hurtado et al. 2009). However, it is important to highlight the raised level of *R. norvegicus* infection by *Toxocara* spp. in natural conditions (Chieffi et al. 1981), suggesting a role for this rat as a potential reservoir for *Toxocara* spp. in the environment.

REFERENCES

- Akao N, Takayanagi TH, Suzuki R, Tsukidate S, Fujita K 2000. Ocular larva migrans caused by *Toxocara cati* in Mongolian gerbils and a comparison of ophthalmologic findings with those produced by *T. canis*. *J Parasitol* 86: 1133-1135.
- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA, Valdivia-Anda G, Tórtora JL, Ortega-Pierres MG 2009. *Toxocara canis*: larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol* 122: 1-5.
- Araújo P 1972. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14: 89-90.
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL 1994. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminth* 68: 350-360.
- Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW 1952. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. *Pediatrics* 9: 7-19.
- Chieffi PP, Del Guercio VM, Ueda M, Mello LB 1981. Importância de *Rattus norvegicus* capturados no município de São Paulo, SP, Brasil, como hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis* (Ascaroidea, Nematoda). *Rev Inst Adolfo Lutz* 41: 89-91.
- Coat N, Schnieder T, Epe C 2004. Vertical transmission of *Toxocara cati* Schrank 1788 (Anisakidae) in the cat. *Parasitol Res* 92: 142-146.
- Cox DM, Holland CV 2001. Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *J Helminth* 75: 33-41.
- Dubey JP 1968. Migration of *Toxocara cati* larvae in mice. *Trop Geogr Med* 20: 172-176.
- Fisher M 2003. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol* 19: 167-170.
- Havasiová-Reiterová K, Tomasovicová O, Dubinský P 1995. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res* 81: 13-17.
- Lescano SAZ, Queiroz, ML, Chieffi PP 2004. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 627-628.
- Sakai R, Kawashima H, Shibui H, Kamata K, Kambara C, Matsuoaka H 1998. *Toxocara cati*-induced ocular toxocariasis. *Arch Ophthalmol* 116: 1686-1687.
- Schantz PM 1989. *Toxocara* larva migrans now. *Am J Trop Med Hyg* 41 (Suppl. 3): 21-34.
- Sprent JFA 1956. The life history and development of *Toxocara cati* (Schrank 1788) in the domestic cat. *Parasitology* 46: 54-78.
- Wang GX, Luo ZJ 1998. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *J Helminthol* 72: 183-184.