

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Avaliação do efeito imunossupressor da ciclosporina A em camundongos
infectados experimentalmente com *Toxocara canis***

Wesley Douglas da Silva Terto

Pelotas, 2016

Wesley Douglas da Silva Terto

Avaliação do efeito imunossupressor da ciclosporina A em camundongos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Parasitologia).

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila

Pelotas, 2016

T332a Terto, Wesley Douglas da Silva

Avaliação do efeito imunossupressor da ciclosporina A em camundongos infectados experimentalmente com *Toxocara canis* / Wesley Douglas da Silva Terto. – 49f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2016. – Orientador Maria Elisabeth Aires Berne; coorientador Luciana Farias da Costa de Avila.

1.Parasitologia. 2.Toxocaríase. 3.Anticorpos.
4.Imunossupressão. I.Berne, Maria Elisabeth Aires. II.
Avila, Luciana Farias da Costa de. III.Título.

CDD: 574.293

Wesley Douglas da Silva Terto

Avaliação do efeito imunossupressor da ciclosporina A em camundongos infectados experimentalmente com *Toxocara canis*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 25/02/2016

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Maria Elisabeth Aires Berne (Orientadora)
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dr. Carlos James Scaini
Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela
Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Dr^a Michele Soares Pepe
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Luciana Farias da Costa de Avila (Suplente)
Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Aos meus pais (Heron e Miriam) e irmãos, por todo amor e cuidado e aos familiares, que me apoiam e ajudam em tudo que necessito.

Agradeço de coração à minha orientadora, Prof^a. Beth, que me acolheu com muito carinho, esteve sempre disponível e atenta às necessidades da pesquisa, por toda a paciência que teve comigo, por me fazer sentir protegido mesmo estando longe da minha família... Gratidão é o que sinto ao escrever isto. Sou muito grato pela oportunidade de ser um dos filhos científicos da Beth.

Não posso deixar de agradecer também, a minha co-orientadora, Prof^a. Luciana, por ser tão atenciosa. Sou grato por tudo, por fazer que eu me sentisse mais confiante, pelas palavras de incentivo, pelo tempo gasto com o trabalho... Muito bom saber que começou sua carreira acadêmica de forma brilhante. Me sinto feliz por ser um dos seus primeiros orientados...

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Helminologia (LAB XII), Micaele, Natália, Leonardo por todo o auxílio no experimento, companheirismo e pelas boas risadas.

As queridas Gabi, Sol e Antonieta, pela ajuda que me deram.

Aos estagiários (Tairan, Flor e Isis) que contribuíram em algumas etapas da pesquisa, pois sozinho jamais conseguiria...

Agradeço também à equipe do Biotério Central, em especial a Fabiane, nossa querida Fabi, que não tem medido esforços para auxiliar os estudantes em suas pesquisas.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia e Imunologia (LAB XI), Jéssica, Ana Paula e Ana Viana pela amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos que fiz durante o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço muito aos professores do PPG Parasitologia, que contribuíram para a minha formação no mestrado, bem como a Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade concedida para a realização do curso de Pós-Graduação;

A todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Principalmente, sou grato a Deus pela vida, por ser o meu guia em todos os momentos e por me dar forças para enfrentar as lutas diárias.

Muito obrigado!

“Posso todas as coisas Naquele que me fortalece.”

Filipenses, 12.13

Resumo

TERTO, Wesley Douglas da Silva. **Avaliação do efeito imunossupressor da ciclosporina A em camundongos infectados experimentalmente com *Toxocara canis***. 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A toxocaríase é uma doença zoonótica que apresenta ampla distribuição mundial. A relação de doenças parasitárias com a imunossupressão farmacológica tem sido muito enfatizada. Fármacos imunossupressores são utilizados no tratamento de doenças autoimunes e por pacientes submetidos a transplantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Ciclosporina A (CsA) sobre a intensidade de infecção e a resposta humoral de camundongos *Swiss* infectados experimentalmente com *Toxocara canis*. Para a realização deste estudo, os camundongos foram inoculados com 1200 ovos embrionados, pela via intragástrica. Foram formados três grupos experimentais com 10 animais por grupo: O G1 e G2 foram tratados com CsA 10 mg/Kg e 50 mg/Kg, por via oral, 15 dias antes da infecção experimental, respectivamente. O G3 (controle) recebeu solução de salina, pela mesma via e período. Foi avaliada a cinética da produção de anticorpos anti-*Toxocara* nos dias zero, 15 e 30 pós-inoculação (P.I). No dia 30 P.I os animais foram submetidos à eutanásia e foi realizada a recuperação de larvas em tecidos de órgãos e musculatura estriada esquelética (carcaça) por digestão tecidual. Os animais que receberam a dose maior do fármaco (50 mg/Kg) obtiveram uma intensidade de infecção 65,5% maior em relação ao grupo controle ($p= 0,001$). Quando o fármaco foi administrado na dose de 10 mg/Kg não foram observadas diferenças significativas com relação ao grupo controle. Observou-se que no 15º dia P.I, os grupos tratados com CsA apresentaram média mais elevada nos níveis de anticorpos produzidos, não havendo diferença significativa no 30º dia. Conclui-se que a imunossupressão desencadeada pela CsA (50 mg/Kg) promoveu o estabelecimento de maior número de larvas, o que foi evidenciado na recuperação destas. Aqui alerta-se para necessidade de um acompanhamento, quanto a toxocaríase em pacientes que utilizam esse fármaco.

Palavras-chave: toxocaríase; anticorpos; imunossupressão

Abstract

Terto, Wesley Douglas da Silva. **Evaluation of immunosuppressive effect of cyclosporin A in *Toxocara canis* experimentally infected mice** 2016. 49f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Toxocariasis is a zoonotic worldwide distributed disease. Relationship between parasitic diseases and pharmacological immunosuppression has been widely studied and emphasized. Immunosuppressants are used in autoimmune diseases treatment and transplant patients. The aim of this study was to evaluate the effect of cyclosporine A (CsA) intensity in infection and humoral response in Swiss mice experimentally infected with *Toxocara canis*. In this study, 1,200 gavage fertilized eggs were inoculated in the mice by intragastric. Three experimental groups of 10 animals each were formed. The G1 group and G2 group were treated with 10 mg/Kg and 50 mg/Kg of CsA respectively, orally administered 15 days before eggs inoculation. The G3 control group received saline solution at same way and period of the groups G1 and G2. Kinetics profile of anti-*Toxocara* antibodies production were evaluated on zero, 15 and 30 days post-inoculation (P.I), and at the 30 days P.I. the animals were euthanized. Infection intensity was assessed. Animals receiving the highest dose of the drug (50 mg/Kg) had infection intensity of 65.5% higher comparing to control group ($p = 0.001$). Significant difference wasn't observed between G1 group and the control group. It was observed on day 15 P.I. that the groups treated with CsA obtained higher average levels of antibodies production, differently of the 30th day where no significant difference was found. It was concluded that immunosuppression triggered by CsA (50 mg / kg) promoted the establishment of more larvae, which was evidenced in the recovery of these. We alert up here for the need of care of Toxocariasis infected patients using this drug.

Keywords: toxocariasis; ciclosporin; immunosuppression

Lista de Tabelas

MANUSCRITO

- Tabela 1 Número de larvas de *Toxocara canis* (média $\pm$ desvio-padrão) recuperadas em órgãos e musculatura esquelética de camundongos previamente tratados com ciclosporina A (n=10). 26
- Tabela 2 Níveis de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) totais anti-*Toxocara* em camundongos *Swiss* tratados com Ciclosporina A e posteriormente infectados por ovos de *T. canis*, nos dias zero, 15 e 30 dias pós-inoculação (n=10). 28
- Tabela 3 Coeficiente de correlação entre o número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de órgãos e musculatura estriada esquelética e níveis de anticorpos totais produzidos contra *Toxocara canis* em camundongos *Swiss* tratados com Ciclosporina A (n=10). 29

Lista de Figuras

MANUSCRITO

- Figura 1 Média do número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de órgãos e musculatura estriada esquelética de camundongos tratados com ciclosporina A (n = 10)..... 27
- Figura 2 Níveis de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) totais anti-*Toxocara* em camundongos *Swiss* tratados com Ciclosporina A e inoculados com ovos de *T. canis*, nos dias zero, 15 e 30 dias pós-inoculação (n=10)..... 28
- Figura 3 Esplenomegalia acentuada em camundongo *Swiss* tratado com CsA (50 mg/Kg), inoculado com ovos de *Toxocara canis* e submetido à eutanásia 30 dias pós-inoculação. 1. Baço de camundongo do grupo controle; 2. baço de camundongo tratado com CsA 50 mg/Kg..... 29

Sumário

1.	Introdução.....	11
2.	Objetivos.....	11
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	Revisão de Literatura.....	14
3.1	<i>Toxocara canis</i> e ciclo biológico.....	14
3.2	Toxocaríase.....	15
3.3	Imunossupressão e parasitoses.....	17
3.4	Ciclosporina A.....	18
4.	Manuscrito.....	21
	Resumo.....	21
	Abstract.....	22
	Introdução.....	22
	Material e Métodos.....	23
	Resultados.....	26
	Discussão.....	29
	Agradecimentos.....	32
	Referências.....	33
5.	Considerações finais.....	37
	Referências.....	38
	Anexos.....	46

1. Introdução

A toxocaríase é uma doença de caráter zoonótico (KATAGIRI & OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; TAIRA *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2012) causada por ação de parasitos pertencentes ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaroidea e Família Anisakidae, sendo as principais espécies relacionadas à infecção, *Toxocara canis* (LEE *et al.*, 2010) e *Toxocara cati* (FISHER, 2003). Estes parasitos têm como hospedeiros definitivos cães e gatos, respectivamente. Nestes hospedeiros, são encontradas as formas adultas no intestino delgado (DESPOMMIER, 2003). Embora os principais registros patológicos em humanos sejam referidos à *T. canis*, há também casos relacionados à *T. cati*, porém, com menor frequência (ROSSACK *et al.*, 2008; FU *et al.*, 2014).

Estudos tem relatado a reativação de formas latentes de parasitos em indivíduos imunossuprimidos patologicamente ou submetidos à imunossupressão farmacológica (FERREIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011; BRUM *et al.*, 2013). Em estudos experimentais foi observado que camundongos BALB/c imunossuprimidos antes da infecção por *T. canis* apresentaram uma maior intensidade de infecção (LESCANO *et al.*, 2004; AVILA *et al.*, 2012).

A imunossupressão refere-se à redução da eficiência do sistema imunológico, e é usualmente aplicada para que haja redução quanto às chances de rejeição de órgãos. Medicamentos imunossupressores são utilizados para o tratamento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal, entre outras (REZENDE, 2011; BRAZ, *et al.*, 2015; CASTRO *et al.*, 2015).

A relação do uso de medicamentos imunossupressores e a ocorrência de parasitoses é, por si, desvantajosa. A supressão do sistema imune pode permitir a reativação do parasito que outrora se encontrava em estado de quiescência, ocasionando uma maior intensidade de infecção parasitária. Este fato é importante principalmente no caso das protozooses, possibilitando que tais parasitos se

disseminem pelo organismo intensificando a infecção (SILVA *et al.*; 2011; BRAZ *et al.* 2015).

Considerando a elevada soroprevalência de *T. canis* registrada no Brasil (SOUZA *et al.*, 2011; SCHOERNADIE *et al.*, 2013), assim como o elevado número de pessoas que utilizam medicações imunossupressoras (GUERRA JUNIOR *et al.*, 2010; ACURCIO *et al.*, 2013), torna-se importante que estudos relacionados à infecção por este nematódeo e sua relação com a imunossupressão sejam mais explorados. Assim, para uma melhor compreensão da importância da competência do sistema imune no curso desta infecção, este estudo visou avaliar o efeito da Ciclosporina em camundongos, que são os modelos experimentais mais utilizados para o estudo da toxocaríase humana.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar o efeito da ciclosporina A sobre a intensidade de infecção em camundongos *Swiss* infectados experimentalmente por *Toxocara canis*.

2.2. Específicos

Determinar o efeito de duas doses de ciclosporina A administradas previamente à infecção com ovos de *Toxocara canis* em camundongos.

Verificar a intensidade de infecção de *Toxocara canis* em camundongos tratados com ciclosporina A.

Avaliar a cinética da produção de anticorpos IgG anti-*Toxocara canis* em camundongos tratados com ciclosporina A.

Relacionar os níveis totais de anticorpos IgG anti-*Toxocara canis* com a intensidade de infecção.

3. Revisão de literatura

3.1. *Toxocara canis* e ciclo biológico

O parasito *Toxocara canis* Werner (1782), pertence ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaroidea e Família Anisakidae (LEE *et al.*, 2010). Tem como hospedeiros definitivos, principalmente cães jovens, e apresenta representatividade de hospedeiros paratênicos e acidentais, inclusive o homem (CARVALHO & ROCHA, 2011).

Nos cães, hospedeiros definitivos, a infecção ocorre através da ingestão de ovos contendo larva de terceiro estágio (L3) em seu interior (forma infectante) tendo, uma migração hepato-pulmonar-traqueal (SANTARÉM *et al.*, 2009). A seguir, ocorre o desenvolvimento do parasito na forma adulta no intestino delgado e, conseqüentemente, a eliminação de ovos pelas fezes. A fêmea de *T. canis* é capaz de produzir até 200.000 ovos por dia (BARRIGA, 1991), possibilitando a elevada contaminação do meio ambiente (TRAVERSA *et al.*, 2014).

Nos cães adultos, que já desenvolveram uma resposta imune ao *T. canis*, a migração hepato-pulmonar-traqueal é incomum, não havendo o desenvolvimento dos parasitos até a forma adulta. As larvas ingeridas atingem a circulação, migram por diversos órgãos, encistam-se e permanecem em latência por períodos prolongados (OVERGAAUW, 1997). Em cadelas prenhes por alterações hormonais e baixa de imunidade, as larvas deixam o estado de hipobiose e, através da via transplacentária, migram para o feto, ou ainda pode ocorrer à transmissão transmamária com larvas eliminadas no colostro e/ou no leite (KRAMER, *et al.*, 2006; AIRES *et al.*, 2008).

Apesar de *T. canis* ser descrito como um parasito de cães, também pode infectar os gatos, pela ingestão de ovos contendo larvas infectantes ou também através da ingestão de presas, contendo larvas nos tecidos (hospedeiros paratênicos), como ratos, pássaros, minhocas e insetos (FISHER, 2003).

3.2. Toxocaríase

O primeiro relato de infecção humana causada por larvas de *Toxocara canis*, ocorreu, quando Wilder (1950) descreveu achados de granulomas eosinofílicos em crianças com infecção ocular, denominando-a de Larva Migrans Ocular (LMO). Outros estudos seguiram, como o descrito por Beaver (1952) que relatou achados de larvas no fígado de crianças, o que seria a Larva Migrans Visceral (LMV). A partir de então, surgem relatos em diversos estudos, caracterizando a patogenia da toxocaríase e ampliando os conhecimentos acerca desta parasitose, que até então, pouco se conhecia (MIKHAEL *et al.*, 1974; BASS *et al.*, 1983; GLICKMAN *et al.*, 1987; RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2013).

Um fator responsável pela manutenção da infecção por *T. canis* é a contaminação do solo de praças e outros ambientes públicos realizadas pelos hospedeiros definitivos (cães e gatos), possibilitando a infecção de crianças que apresentam geofagia e onicofagia, hábitos comuns desta faixa etária (MOURA *et al.*, 2013). Além disso, a presença de hospedeiros definitivos de *Toxocara* spp. em locais onde há produção de hortaliças pode aumentar o risco de infecção. O homem pode se infectar através da ingestão destes alimentos, bem como por meio da ingestão de água contaminada por ovos embrionados (TERTO *et al.*, 2014). Outra possibilidade é através da ingestão de vísceras cruas ou mal cozidas de hospedeiros paratênicos, contendo larva L3, forma infectante do parasito (STRUBE *et al.*, 2013).

A toxocaríase apresenta-se com prevalência mais elevada nas regiões tropicais, sendo que no Brasil a soroprevalência em adultos varia de 3,72% a 40% (CHIEFFI *et al.*, 2009; ROLDÁN & ESPINOSA, 2009). Estudos mais recentes têm mostrado a prevalência desta doença em diversas regiões do mundo, com sintomas e sinais clínicos variados, sendo as crianças mais acometidas, chegando a índices de prevalência de 50% (SCHOENARDIE *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014, GRAMA *et al.*, 2014; GYANG *et al.*, 2015).

A toxocaríase ocorre em maior parte nos países que estão em desenvolvimento (DELGADO & RODRÍGUEZ-MORALES, 2009), porém não é incomum a ocorrência em países desenvolvidos (LEE *et al.*, 2014; WALSH & HASEEB, 2014). As formas clínicas da doença são: toxocaríase oculta, neurológica, ocular e visceral (DESPOMMIER, 2003; BROUCKE *et al.*, 2015). Estas últimas,

podem ser discriminadas como síndrome da larva *migrans* ocular e síndrome da larva *migrans* visceral (RÓLDAN *et al.*, 2010; SANTOS, 2012), apesar de que o termo 'larva *migrans*' também seja usado para indicar infecção parasitária causada por outros parasitos que também realizam migrações em tecidos e órgãos (PARK *et al.*, 2000; PERLMAN *et al.*, 2010). A toxocaríase visceral pode acometer diversos órgãos e tecidos, incluindo fígado, pulmões, coração, encéfalo, dentre outros (SMITH *et al.*, 2009; MORII *et al.*, 2015).

A infecção humana inicia-se a partir da ingestão de ovos embrionados, contendo a L3 no seu interior. Os ovos passam por todo sistema gastroesofágico, chegam ao intestino delgado e, através da ação de enzimas e do meio ácido são rompidos. A partir daí as larvas emergem e penetram na parede do intestino delgado, entrando na circulação sistêmica e podendo invadir vários órgãos. Nos seres humanos não ocorre o desenvolvimento do parasito adulto e a eliminação de ovos nas fezes, o que acontece normalmente no hospedeiro definitivo (DESPOMMIER *et al.*, 2003; CARVALHO & ROCHA, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2013; STRUBE *et al.*, 2013).

A resposta inflamatória é desencadeada a partir da liberação de produtos de excreção e secreção da larva (TES) que são proteases e proteínas glicosiladas de diversos pesos moleculares, sendo os mais citados na literatura TES-120 e TES-32 (MAIZELS *et al.*, 1984, LOUKAS *et al.*, 2000). Estes antígenos de excreção e secreção ativam a resposta imune do hospedeiro, originando mecanismos imunopatogênicos que contribuem para o surgimento das formas clínicas da doença (GONZALES, 2014).

Na fase aguda da doença, geralmente há resposta celular mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), promovendo aumento de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (ENKO *et al.*, 2009). Na fase crônica formam-se granulomas repletos de macrófagos que circundam as larvas na tentativa de inibir a sua migração (TORINA *et al.*, 2005), no entanto, estas podem permanecer viáveis no tecidos. Nesta fase a resposta imune é mediada por células T auxiliares de tipo 2 (Th2) e está relacionada a produção de anticorpos anti-*Toxocara canis* (PAWLOWSKI, 2001; CARVALHO & ROCHA *et al.*, 2011). A manifestação clínica da doença é bastante variada e depende de fatores como imunidade, estado nutricional, idade e localização das larvas no organismo, podendo se apresentar assintomática ou com quadros clínicos variados (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013).

3.3. Imunossupressão e parasitoses

O histórico das parasitoses intestinais no Brasil caracterizou-se por mudanças que ocorreram a partir da década de 80, quando as notificações de óbitos passaram a ser documentadas. Tais doenças foram responsáveis por casos de óbitos de 6,1 a cada 10.000 homens, alcançando índices altíssimos. Com a melhoria na qualidade de vida da população, houve um avanço na redução, sendo mais prevalente nas regiões Norte e Nordeste, estando relacionada às condições socioambientais e econômicas (PAES & SILVA, 1999; BASSO *et al.*, 2008).

Embora tenham ocorrido melhorias sociais nos últimos anos relacionadas ao saneamento básico e ao advento do Sistema Único de Saúde (SUS), o Brasil ainda é um país onde a prevalência de parasitoses apresenta-se alta. A partir da década de 1980, com o surgimento dos primeiros casos da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), maior atenção tem sido destinada a pacientes imunocomprometidos, devido às inúmeras mortes em decorrência das doenças oportunistas (VILLARINHO *et al.*, 2013). Dentre estas, as coccídeo-parasitoses e os problemas neurológicos advindos da toxoplasmose (BERNSTEEN *et al.*, 1999).

O perfil das doenças parasitárias apresentou mudanças nos últimos anos (WALDMAN *et al.*, 1999), principalmente, com o surgimento de doenças, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (FERREIRA *et al.*, 2008), os cânceres e outras doenças autoimunes (SILVA *et al.*, 2011; DARANI & YOUSEFI, 2012), nas quais, são utilizadas medicações imunossupressoras. A utilização destas medicações promoveu um aumento na ocorrência e na notificação das parasitoses, ou seja, as doenças parasitárias passaram a afetar grupos específicos de indivíduos que se tornaram suscetíveis por causa da ação deficitária do sistema imune (BRAZ *et al.*, 2015).

Os fármacos imunossupressores agem de forma a suprimir o sistema imunitário contra os antígenos próprios e não próprios que atuam no organismo, permitindo que os pacientes acometidos por doenças que requerem tal tratamento adquiram uma melhoria na qualidade de vida (BRESSAN *et al.*, 2010). Tal melhoria pode ser questionada, uma vez que os pacientes sejam portadores de agentes parasitários quiescentes, antes da adesão ao tratamento imunossupressor ou

durante o mesmo (YOSHIDA *et al.*, 2006). Diversos protozoários são relacionados a uma maior intensidade de infecção em pacientes imunocomprometidos, dentre estes: *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., e algumas espécies de microsporídeos (FERREIRA *et al.*, 2000). A ativação de um agente parasitário, como é o caso dos protozoários, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, pode permitir consequências graves, levando a quadros clínicos complicados, como problemas neurológicos, cardíacos, dentre outros (FISHMAN, 2011; RIGANTI *et al.*, 2012). Estudos têm relatado a importância da utilização de medicações imunossupressoras e sua relação com a intensidade de infecção das parasitoses, principalmente quando se refere a parasitos oportunistas (FERREIRA *et al.*, 2008; ABDEL-HAFEEZ *et al.*, 2012). Tais estudos já demonstram que há agravamento da doença parasitária, como é o caso da criptosporidiose com uso concomitante de imunossupressor (HUNTER & NICHOLS, 2002).

Apesar da maioria dos relatos referentes à reativação de um agente parasitário, que outrora se encontrava em quiescência, sejam relacionados a protozoários (FERREIRA, 2000; FERREIRA *et al.*, 2008), os helmintos também apresentam esta importância, principalmente nas fases larvais que podem realizar migrações teciduais causando reações imunopatológicas diversificadas (GLICKMAN *et al.*, 1979; GAZZINELLI-GUIMARÃES *et al.*, 2013). *Strongyloides stercoralis* é um exemplo importante, pois, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro, bem como da intensidade da infecção, pode se disseminar causando diversos danos imunopatológicos (FERREIRA *et al.*, 2008; BRAZ *et al.*, 2015).

Estudos sobre parasitos teciduais, como *Toxocara canis*, e a relação da infecção com o uso de medicações imunossupressoras, devem ser realizados, já que no Brasil, a prevalência da toxocaríase em adultos chega a 40% em algumas regiões (CHIEFFI *et al.*, 2009) e em crianças pode ultrapassar os 50% (FIGUEIREDO *et al.*, 2005; SCHOENARDIE *et al.*, 2013).

3.4. Ciclosporina A

Estudos experimentais têm sido realizados com intuito de relacionar o uso concomitante de medicações imunossupressoras com a ocorrência de

enteroparasitoses, parasitos teciduais ou hematozoários (MATSUZAWA *et al.*, 1998; LESCANO *et al.*, 2004; OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2007; DIAS, 2011; AVILA *et al.*, 2012; LALO & HIRSCHFELD, 2012). Estes estudos têm possibilitado analisar como se comporta a infecção por agentes parasitários em modelos experimentais submetidos à imunossupressão farmacológica.

A ciclosporina (CsA) é originalmente derivada do fungo *Tolypocladium inflatum gams* (LIN-WANG & MANRIQUE, 2002), fazendo parte dos constituintes inibidores da calcineurina. Este fármaco atua em linhagem específica de células de defesa, as células linfoides, apresentando, portanto seletividade na atuação, não exercendo efeito em células de origem mieloide. A sua ação imunossupressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina (GARCIA *et al.*, 2004). O primeiro relato que menciona a ação imunossupressora deste fármaco ocorreu em 1978, quando foi utilizado para realização de transplante de órgão sólido (MACOVIK *et al.*, 1985). A partir de então, a sua utilização tem se expandido de forma gradual, sendo útil para impedir a rejeição de órgãos transplantados assim como para o tratamento de várias doenças autoimunes (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005).

O efeito antiparasitário deste fármaco, já foi relatado anteriormente. Matsuzawa *et al.* (1998) administraram a camundongos na dose de 100 mg/Kg/dia previamente à infecção com ovos de *Hymenolepis nana*. Os autores observaram que houve redução no número de cisticercos quando compararam com o grupo controle, sugerindo que há ação antiparasitária exercida pela CsA, e isto depende de fatores como o agente parasitário em questão, bem como a dose do fármaco.

O efeito imunossupressor de ciclosporina foi observado em um estudo que utilizou como modelo experimental camundongos BALB/c, no qual se verificou aumento significativo na taxa de recuperação de larvas de *T. canis* na dose de 50 mg/Kg (Lescano *et al.*, 2004). Apesar de descrições na literatura mostrarem o efeito imunossupressor da CsA, Dias *et al.* (2013) ao estudar a infecção por *Ancylostoma ceylanicum* em hamster, ressaltou que este fármaco não interferiu no curso da infecção. Além disso, camundongos infectados por uma cepa Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, que foram tratados com CsA em doses menores que 20 mg/Kg durante três semanas não apresentaram aumento significativo da parasitemia e da mortalidade (MAGALHÃES, 2012). Provavelmente a imunossupressão e o

consequentemente aumento na intensidade da infecção estão relacionados à dose do fármaco.

Em relação às infecções humanas, a atividade imunossupressora da CsA também foi mencionada por Ferreira *et al.* (2008) em um relato de caso de uma paciente que apresentou disseminação de larvas de *Strongyloides stercoralis* pela via hematogênica, com o paciente evoluindo para o óbito. Ainda, Amato *et al.*, (1997) relataram um caso de aparecimento de lesões cutâneas através da reativação do parasitismo por *T. cruzi*, em paciente acometida de doença de Chagas em fase crônica e receptora de rim por transplante e tratada com CsA.

4. MANUSCRITO - Imunossupressão promovida por ciclosporina A aumenta a intensidade de infecção por *Toxocara canis* em camundongos Swiss

RESUMO

A toxocaríase é uma doença zoonótica que apresenta ampla distribuição mundial. A relação de doenças parasitárias com a imunossupressão farmacológica tem sido muito enfatizada. Fármacos imunossupressores são utilizados no tratamento de doenças autoimunes e por pacientes submetidos a transplantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da Ciclosporina A (CsA) sobre a intensidade de infecção e a resposta humoral de camundongos Swiss infectados experimentalmente com *Toxocara canis*. Para a realização deste estudo, os camundongos foram inoculados com 1200 ovos embrionados, pela via intragástrica. Foram formados três grupos experimentais com 10 animais por grupo: O G1 e G2 foram tratados com CsA 10 mg/Kg e 50 mg/Kg, por via oral, 15 dias antes da infecção experimental, respectivamente. O G3 (controle) recebeu solução de salina, pela mesma via e período. Foi avaliada a cinética da produção de anticorpos anti-*Toxocara* nos dias zero, 15 e 30 pós-inoculação (P.I). No dia 30 P.I os animais foram submetidos à eutanásia e foi realizada a recuperação de larvas em tecidos de órgãos e musculatura estriada esquelética (carcaça) por digestão tecidual. Os animais que receberam a dose maior do fármaco (50 mg/Kg) obtiveram uma intensidade de infecção 65,5% maior em relação ao grupo controle ($p= 0,001$). Quando o fármaco foi administrado na dose de 10 mg/Kg não foram observadas diferenças significativas com relação ao grupo controle. Observou-se que no 15º dia P.I, os grupos tratados com CsA apresentaram média mais elevada nos níveis de anticorpos produzidos, não havendo diferença significativa no 30º dia. Conclui-se que a imunossupressão desencadeada pela CsA (50 mg/Kg) promoveu o estabelecimento de maior número de larvas, o que foi evidenciado na recuperação destas. Aqui alerta-se para necessidade de um acompanhamento, quanto a toxocaríase em pacientes que utilizam esse fármaco.

Palavras-chave: toxocaríase; ciclosporina; imunossupressão;

ABSTRACT

Toxocariasis is a zoonotic worldwide distributed disease. Relationship between parasitic diseases and pharmacological immunosuppression has been widely studied and emphasized. Immunosuppressants are used in autoimmune diseases treatment and transplant patients. The aim of this study was to evaluate the effect of cyclosporine A (CsA) intensity in infection and humoral response in Swiss mice experimentally infected with *Toxocara canis*. In this study, 1,200 gavage fertilized eggs were inoculated in the mice by intragastric. Three experimental groups of 10 animals each were formed. The G1 group and G2 group were treated with 10 mg/Kg and 50 mg/Kg of CsA respectively, orally administered 15 days before eggs inoculation. The G3 control group received saline solution at same way and period of the groups G1 and G2. Kinetics profile of anti-*Toxocara* antibodies production were evaluated on zero, 15 and 30 days post-inoculation (P.I), and at the 30 days P.I. the animals were euthanized. Infection intensity was assessed. Animals receiving the highest dose of the drug (50 mg/Kg) had infection intensity of 65.5% higher comparing to control group ($p = 0.001$). Significant difference wasn't observed between G1 group and the control group. It was observed on day 15 P.I. that the groups treated with CsA obtained higher average levels of antibodies production, differently of the 30th day where no significant difference was found. It was concluded that immunosuppression triggered by CsA (50 mg / kg) promoted the establishment of more larvae, which was evidenced in the recovery of these. We alert up here for the need of care of Toxocariasis infected patients using this drug.

Keywords: toxocariasis; ciclosporin; immunosuppression;

Introdução

A toxocaríase é uma zoonose amplamente difundida (OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2002; MENDONÇA *et al.*, 2012; SARIEGO *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2015; FIALHO & CORRÊA, 2016), sendo as principais espécies relacionadas à infecção, *Toxocara canis* (LEE *et al.*, 2010) e *Toxocara cati* (FISHER, 2003). As crianças apresentam maior susceptibilidade à infecção por *Toxocara canis* (GUILHERME *et al.*, 2013; FAN *et al.*, 2013), principalmente devido ao contato com ovos larvados em áreas de recreação, parques, praças e caixas de areia (TINOCO-GRACIA *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 2004; TRAVERSA *et al.*, 2014) e a prática de geofagia e onicofagia (TINOCO-GRACIA *et al.*, 2008; SHARGHI *et al.*, 2001). Associado a isto está o fato de apresentarem o sistema imune ainda imaturo (OLIVEIRA-SEQUEIRA *et al.*, 2002).

A manifestação clínica da doença é variada, podendo ser assintomática (FILLAUX & MAGNAVAL, 2013). Na fase aguda da doença, geralmente há resposta celular mediada por células T auxiliares do tipo 1 (Th1), promovendo aumento de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (ENKO *et al.*, 2009). Na fase crônica, a resposta imune é mediada por células T auxiliares do tipo 2 (Th2) e está relacionada a produção de anticorpos anti-*Toxocara canis* (PAWLOWSKI, 2001; CARVALHO & ROCHA *et al.*, 2011).

Os fármacos imunossupressores atuam de forma a suprimir o sistema imunitário, permitindo que os pacientes adquiram uma melhoria na qualidade de vida (BRESSAN *et al.*, 2010). Contudo, caso estes pacientes sejam portadores de agentes parasitários antes da adesão ao tratamento imunossupressor ou durante o mesmo, podem vir a desenvolver uma parasitose de forma mais grave, sendo importante uma maior atenção inclusive com a realização de exames parasitológicos (BRAZ *et al.*, 2015). A reativação de formas latentes em indivíduos submetidos à imunossupressão farmacológica tem sido extensivamente relatada (SANTOS-NETO *et al.*, 2003; FISHMAN, 2011; RIGANTI *et al.*, 2012, RIZO-TOPETE *et al.*, 2015), sendo a maioria referente à infecções por protozoários.

Contudo, é importante que estudos que relacionem as infecções por helmintos com casos de imunossupressão sejam mais explorados. Em relação à infecção pelo nematódeo *T. canis*, já foram realizados estudos que avaliaram o curso da infecção em modelos experimentais imunocomprometidos (LESCANO *et al.*, 2004; AVILA *et al.*, 2012). Porém, é importante a realização de novas pesquisas para uma melhor compreensão da dinâmica da toxocaríase em modelo experimental imunocomprometido farmacologicamente.

Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da ciclosporina A sobre a intensidade de infecção em camundongos *Swiss* infectados experimentalmente com *Toxocara canis*.

Material e métodos

Animais

Utilizou-se neste experimento um total de 30 camundongos *Swiss*, fêmeas, entre cinco e sete semanas de idade, providas do Biotério Central da Universidade

Federal de Pelotas (UFPEL). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada 22 ($\pm$ 2°C) e ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), tendo ração (sem adição de antibióticos e antifúngicos) e água *ad libitum*.

O manuseio dos animais e os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a legislação Brasileira (LEI Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), após parecer favorável do CEEA - Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - 7921-2014).

Recuperação de *Toxocara canis* adultos e embrionamento dos ovos

Cães com idade entre quatro e oito semanas foram tratados com pamoato de pirantel (15 mg/Kg) para a eliminação de formas adultas de *T. canis*. Após, foi realizada a sexagem, identificação específica das formas adultas e histerectomia para coleta dos ovos.

Os ovos de *T. canis* foram colocados em frascos previamente identificados, e incubados em formalina 2%, a 28°C, umidade acima de 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias. Após, observou-se a motilidade das larvas no interior dos ovos embrionados (AVILA *et al.*, 2012).

Delineamento experimental

Para a realização do experimento foram formados três grupos de 10 camundongos (G1, G2, e G3). Os camundongos do G1 e G2 receberam Ciclosporina A (CsA – Sandimmun®), na dose de 10 mg/Kg e 50 mg/Kg, respectivamente. A administração de CsA foi realizada por via oral, em dias alternados, durante 15 dias antes da infecção experimental. Os animais do G3 (controle) receberam doses de PBS, durante o mesmo período pela mesma via. A seguir, foi realizada administração oral de aproximadamente 1.200 ovos embrionados, por camundongo, utilizando uma sonda intragástrica (AVILA, 2012).

Recuperação de larvas de *Toxocara canis* pela técnica de digestão tecidual

Ao final do período experimental (30 dias) os animais foram submetidos à eutanásia. Posteriormente, foi realizada a técnica de recuperação das larvas de *Toxocara canis* por meio da digestão tecidual de órgãos (fígado, pulmões, encéfalo, rins, coração e olhos) e musculatura esquelética utilizando solução de pepsina 1% e ácido clorídrico (HCl) 1%, mantendo sob agitação, a 37° C por 24 horas (Wang & Luo, 1998).

Avaliação da cinética de produção de anticorpos totais anti-*Toxocara canis* pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

Para a realização da pesquisa de anticorpos totais anti-*Toxocara* foram realizadas três coletas de sangue através do plexo venoso retro-orbitário nos dias zero, 15 e 30 pós-inoculação (P.I). O sangue foi centrifugado a 2000 RPM/10 minutos em uma microcentrífuga (Eppendorf ®) e após, os soros foram separados e mantidos a -20 °C. Para a realização do ELISA indireto, placas de poliestireno foram sensibilizadas com antígeno de secreção e excreção de *T. canis* (TES) na concentração de 1 µg/mL (DE SAVIGNY *et al.*, 1975). A seguir, os soros foram adicionados, em duplicata, na diluição 1:50 e como anticorpo secundário foi utilizado um conjugado de imunoglobulinas totais de camundongo, ligadas a peroxidase (Sigma®), na diluição de 1:5000. A reação foi finalizada com a utilização de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 N. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (ThermoPlate®) em comprimento de onda 492 nm.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS ®), versão 22 para Windows. As variáveis em estudo foram caracterizadas através da média (M) e do desvio-padrão (DP), com os resultados apresentados na forma M ± DP. Foi considerado um nível de significância de 5% para as conclusões dos testes estatísticos.

Utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis (comparação entre três grupos independentes), Teste de Friedman (comparação entre os níveis de anticorpos anti-

T. canis produzidos nos períodos pós infecção – medidas repetidas) e Coeficiente de Correlação (correlação entre o número de larvas e a titulação de anticorpos).

Nos casos em que o Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Friedman foram significativos ($p < 0,05$), foram utilizados os testes de comparações múltiplas pelo procedimento de Dunn para verificar entre que grupos as diferenças são significativas.

Resultados

Tratamento com CsA aumenta a recuperação de larvas de *T. canis*

A intensidade de infecção ($M \pm DP$) nos diferentes órgãos e na musculatura esquelética dos camundongos, dos três grupos em estudo, está apresentada na Tabela 1 e na Figura 1. A média total de larvas recuperadas nos camundongos do G2 (CsA 50 mg/Kg) foi significativamente superior a obtida nos camundongos do G1 (CsA 10 mg/Kg) e do G3 (controle), sendo que a recuperação de larvas no G2 foi de 65,5% maior em comparação ao G3. A recuperação média de larvas no fígado, pulmões, encéfalo e musculatura esquelética (carcaça) também foi significativamente superior no G2 em relação aos demais grupos. Além disso, não houve diferença significativa entre o G1 e G3.

TABELA 1 – Número de larvas de *Toxocara canis* (média $\pm$ desvio-padrão) recuperadas em órgãos e musculatura esquelética de camundongos previamente tratados com ciclosporina A ($n=10$).

VARIÁVEIS	G1 (CsA 10 mg/Kg)	G2 (CsA 50 mg/Kg)	G3 - Controle (PBS)	Teste de Kruskal- Wallis
Fígado	10.50 $\pm$ 6.08 ^a	24.00 $\pm$ 9.68 ^b	12.70 $\pm$ 6.13 ^a	$p = 0,006$
Pulmões	4.40 $\pm$ 2.41 ^a	9.70 $\pm$ 3.37 ^b	5.20 $\pm$ 3.39 ^a	$p = 0,005$
Encéfalo	60.90 $\pm$ 36.23 ^a	122.50 $\pm$ 26.37 ^b	74.20 $\pm$ 24.27 ^a	$p = 0,002$
Rins	1.70 $\pm$ 0.48 ^a	1.00 $\pm$ 1.05 ^a	0.90 $\pm$ 0.99 ^a	$p = 0,067$
Coração	1.50 $\pm$ 1.43 ^a	2.10 $\pm$ 1.73 ^a	0.80 $\pm$ 0.79 ^a	$p = 0,141$
Musculatura	15.60 $\pm$ 4.79 ^a	33.70 $\pm$ 9.07 ^b	23.30 $\pm$ 13.23 ^a	$p = 0,001$
Olhos	0.30 $\pm$ 0.48 ^a	0.70 $\pm$ 0.67 ^a	0.40 $\pm$ 0.52 ^a	$p = 0,323$
Total	94.90 $\pm$ 42.50 ^a	193.70 $\pm$ 33.66 ^b	117.50 $\pm$ 37.02 ^a	$p = 0,001$

^{a,b} não existem diferenças significativas entre grupos com a mesma letra: $p > 0,05$ nos testes de comparações múltiplas pelo procedimento de Dunn.

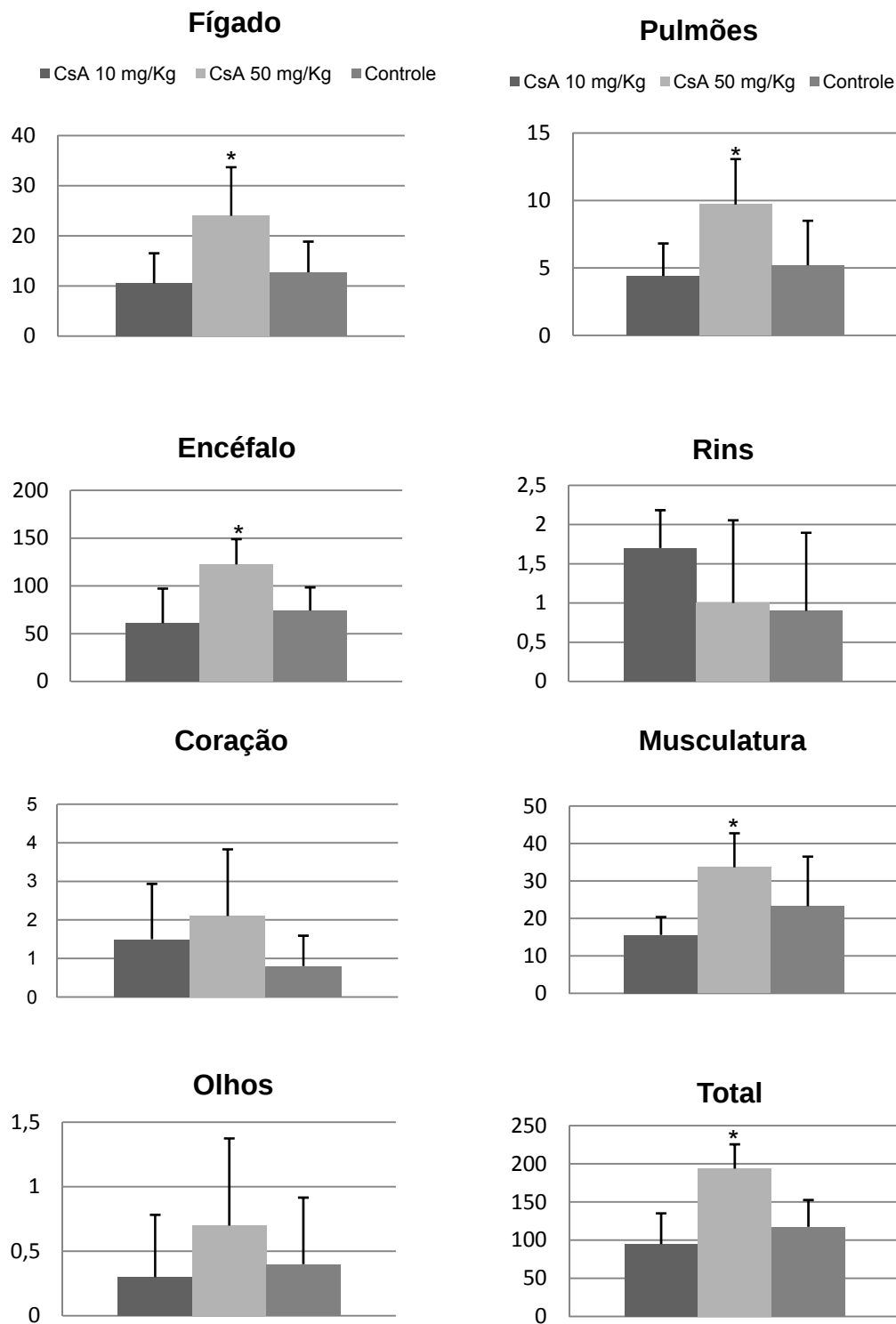


FIGURA 1 – Média do número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de órgãos e musculatura estriada esquelética de camundongos tratados com ciclosporina A (n = 10).

*Existem diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Cinética da produção de anticorpos contra *T. canis*

Na Tabela 2 estão apresentados os níveis médios de anticorpos anti-*Toxocara canis* e a comparação entre os três grupos de camundongos entre os períodos pós-inoculação (P.I). Na comparação entre os grupos foi observada diferença significativa 15 dias P.I sendo que o grupo controle (G3) foi quem apresentou nível médio de anticorpos mais baixo, entretanto, não houve diferença entre os três grupos 30 dias P.I.

Em relação aos períodos pós-inoculação, os testes múltiplos mostraram que os camundongos tratados com CsA (G1 e G2) não ocorreu aumento significativo dos níveis de anticorpos entre 15 e 30 dias P.I., enquanto que no grupo controle (G3) o nível médio de anticorpos 30 dias P.I foi superior significativamente aos 15 dias P.I (ocorreu aumento). A informação da Tabela 2 está apresentada graficamente na Figura 2.

TABELA 2 – Níveis de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) totais anti-*Toxocara* em camundongos Swiss tratados com Ciclosporina A e posteriormente infectados por ovos de *T. canis*, nos dias zero, 15 e 30 dias pós-inoculação (n=10).

GRUPOS	PERÍODOS			Teste de Friedman ⁽¹⁾	Comparações múltiplas		
	Dia zero	Dia 15 P.I	Dia 30 P.I		Dia zero vs. 15 P.I	Dia zero vs. 30 P.I	Dia 15 vs. 30 P.I
G1 - CsA 10 mg/Kg	-	0.331 $\pm$.060	0.329 $\pm$.058	$p = 0,001$	$p = 0,002$	$p = 0,002$	$p = 1,000$
G2 - CsA 50 mg/Kg	-	0.292 $\pm$.068	0.281 $\pm$.048	$p = 0,001$	$p < 0,001$	$p = 0,001$	$p = 0,655$
G3 - Controle	-	0.207 $\pm$.074	0.333 $\pm$.061	$p < 0,001$	$p = 0,014$	$p < 0,001$	$p = 0,034$
Teste de Kruskal-Wallis ⁽²⁾	-	$p = 0,004$	$p = 0,126$				

⁽¹⁾ comparação entre os períodos em cada grupo.

⁽²⁾ comparação entre os três grupos em cada período.

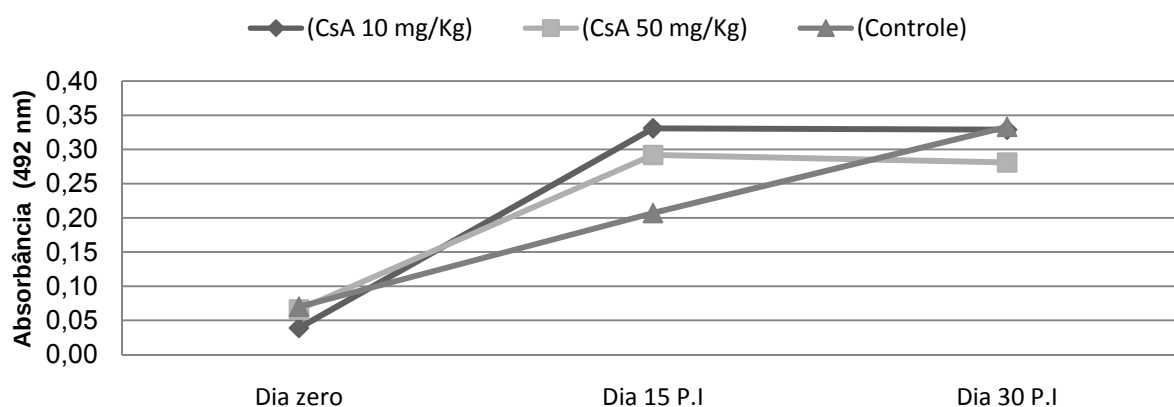


FIGURA 2 – Níveis de anticorpos (média $\pm$ desvio padrão) totais anti-*Toxocara* em camundongos Swiss tratados com Ciclosporina A e inoculados com ovos de *T. canis*, nos dias zero, 15 e 30 dias pós-inoculação (n=10).

Correlação do número de larvas recuperadas com os níveis de anticorpos

Na Tabela 3 está apresentado o coeficiente de correlação entre o número total de larvas e níveis de anticorpos nos dias 15 e 30 P.I em cada grupo experimental.

TABELA 3 – Coeficiente de correlação entre o número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas de órgãos e musculatura estriada esquelética e níveis de anticorpos totais produzidos contra *Toxocara canis* em camundongos Swiss tratados com Ciclosporina A (n=10).

LARVAS	Dia 15 pós-infecção	Dia 30 pós-infecção
G1 - CsA 10 mg/Kg		
Total de Larvas	$r = 0,200$ ($p = 0.580$)	$r = 0,018$ ($p = 0.960$)
G2 - CsA 50 mg/Kg		
Total de Larvas	$r = -0,176$ ($p = 0.627$)	$r = -0,200$ ($p = 0.580$)
G3 – Controle		
Total de Larvas	$r = -0,571$ ($p = 0.084$)	$r = -0,286$ ($p = 0.424$)

r – Coeficiente de Correlação; p – valor de significância.



FIGURA 3 – Esplenomegalia acentuada em camundongo Swiss tratado com CsA (50 mg/Kg), inoculado com ovos de *Toxocara canis* e submetido à eutanásia 30 dias pós-inoculação. 1. Baço de camundongo do grupo controle; 2. baço de camundongo tratado com CsA 50 mg/Kg.

Discussão

Este estudo avaliou duas doses (10 mg/Kg e 50 mg/Kg) de CsA, administradas 15 dias previamente à infecção por *Toxocara canis* em camundongos Swiss. Quando administrada CsA na dose de 50 mg/Kg, foi possível observar

aumento na intensidade de infecção, com um percentual de recuperação das larvas de *T. canis* 65,5% maior em relação ao grupo controle. Os sítios com maior número de larvas recuperadas foram encéfalo e musculatura esquelética, estando de acordo com a fase crônica da infecção, assim como observado por Lescano *et al.* (2004) e Avila *et al.* (2012). O efeito imunossupressor da CsA durante a infecção por *T. canis* já havia sido observado. Semelhante ao presente estudo, Lescano *et al.*, (2004) verificaram que a CsA, usada na dose de 50 mg/Kg, apresentou efeito imunossupressor e aumentou a intensidade de infecção por *T. canis* em camundongos BALB/c infectados com 300 ovos larvados de *T. canis*. Entretanto, no presente estudo, foram avaliados aspectos não testados anteriormente como: a linhagem de camundongo Swiss, número de ovos de 1.200 e dose do fármaco de 10 mg/Kg.

Um achado interessante no presente estudo foi a esplenomegalia observada em todos os camundongos tratados com CsA 50 mg/Kg (Figura 3). É importante destacar que este aumento pode ter sido ocasionado pelo uso do imunossupressor, uma vez que o grupo controle que também foi infectado com ovos de *Toxocara canis* não apresentou esplenomegalia. Tal fato também foi observado por Galván *et al.* (2006), quando administraram este fármaco na dose de 50 mg/Kg a camundongos infectados pelo microsporídio *Encephalitozoon intestinalis*. Apesar deste achado, os autores relataram que não houve disseminação parasitária e nem aumento da infecção por este parasito no grupo imunocomprometido, pois alguns mecanismos poderiam estar envolvidos, impedindo a disseminação como a imunidade inata e a imunidade de mucosa (GALVÁN *et al.*, 2006). Além disso, sabe-se que a eficácia de um determinado tratamento ou fármaco não depende apenas do princípio ativo, mas da dose, da formulação utilizada, da frequência de administração e da duração do tratamento (FÓK & KASSAI, 1998).

Demais estudos experimentais foram realizados para avaliar o efeito da CsA em diferentes parasitoses. A utilização deste fármaco na dose de 30 mg/Kg, em camundongos infectados pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, está associada à lesões no miocárdio e cérebro, bem como elevação nos níveis de parasitemia (MAGALHÃES, 2012). Entretanto, quando a CsA foi administrada em doses menores que 20 mg/Kg, camundongos infectados por *T. cruzi* não apresentaram aumento da parasitemia e da mortalidade (ANDRADE *et al.*, 1997). Resultado semelhante foi observado por Dias *et al.* (2013) que, ao estudarem a infecção por

Ancylostoma ceylanicum em hamster, ressaltaram que este fármaco não interferiu no curso da infecção. Isto ocorreu provavelmente devido a menor dose administrada aos animais (10 mg/Kg), estando de acordo com o observado neste estudo, sugerindo que a dose do fármaco pode estar diretamente relacionada a ocorrência de imunossupressão e consequentemente a maior intensidade da infecção.

O efeito de outros fármacos imunossupressores, como ciclofosfamida, dexametasona e betametasona também foi avaliado na infecção por *T. canis* (LESCANO *et al.*, 2004; EID *et al.*, 2011; AVILA *et al.*, 2012). Assim como observado com CsA, o fármaco ciclofosfamida, utilizado na dose de 50 mg/Kg, causou efeito imunossupressor em camundongos infectados por *T. canis*, promovendo um aumento na intensidade da infecção de 162,1% com relação ao grupo controle (AVILA *et al.*, 2012). Quando a ciclofosfamida foi utilizada na dose de 20 mg/Kg/5 dias em camundongos, observou-se intensificação da infecção no 15º dia P.I, havendo também redução significativa nos níveis de IL-5, citocina importante no controle e produção de eosinófilos (EID *et al.*, 2011). A dexametasona (5 mg/Kg), também apresentou efeito imunossupressor em camundongos com toxocaríase, contudo, a betametasona (1 mg/Kg), não apresentou este efeito, quando administrada após a infecção dos animais (LESCANO *et al.*, 2004; AVILA *et al.*, 2012).

Apesar do aumento nos níveis de anticorpos anti-*Toxocara* já ter sido relacionados à maior intensidade de infecção conforme Avila *et al.* (2012), no presente estudo isso não foi observado. Lescano *et al.* (2004), relataram a ocorrência de um nítido retardo na produção de anticorpos nos animais tratados com CsA 15 dias antes da infecção por *T. canis*, fato não observado no grupo que recebeu CsA 45 dias pós-infecção. Os autores sugerem que o efeito imunossupressor ocorre quando o fármaco é administrado previamente à infecção, porém os mecanismos que justificam isso ainda não estão esclarecidos. No que se refere ao teste de correlação linear, para estabelecer a relação entre os níveis de anticorpos e número de larvas recuperadas, neste estudo não houve relação, tal fato também foi relatado por Avila *et al.* (2012).

Embora outros trabalhos realizados tenham destacado o efeito antiparasitário da CsA em diversas protozooses e helmintoses (CHAPPELL & WASTLING, 1992; BELL *et al.*, 1996; COLEBROOK; JENKINS; LIGHTOWLERS, 2002; DZIK *et al.*, 2006), neste estudo, houve comprovado efeito imunossupressor observado pela maior

intensidade de infecção em camundongos que receberam a dose de 50 mg/Kg. Baseado neste resultado, pode-se inferir que a dose do fármaco está relacionada à sua ação imunossupressora, isto é, doses menores podem não promover efeito imunossupressor, como foi visto por Dias *et al.* (2013).

Atualmente é crescente a utilização de fármacos imunossupressores, sendo assim, a realização de estudos relacionando o efeito imunossupressor de fármacos com a ocorrência de doenças parasitárias apresenta elevada relevância. A partir deste estudo foi possível conhecer a dinâmica da toxocaríase em modelo experimental *Mus musculus* (Swiss), visto que não tinha sido realizado estudo nesta linhagem utilizando a CsA como imunossupressor. A introdução de fármacos imunossupressores no tratamento das doenças autoimunes permitiu que os casos de parasitoses fossem mais notificados (BRAZ *et al.*, 2015), principalmente as protozooses. Contudo, estudar a relação destas medicações com as helmintoses ainda necessita maior atenção.

A ação da ciclosporina como agente imunossupressor foi comprovada neste estudo, desta forma, é importante que sejam tomados os devidos cuidados com os pacientes que dependem deste fármaco para tratamento das doenças autoimunes, bem como pacientes transplantados.

Agradecimentos:

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia e ao Biotério Central da UFPel por toda colaboração prestada, também somos gratos a todos que cooperaram para a concretização deste trabalho.

Referências

- ANDRADE, S.G.; CARNEIRO FILHO, A.; SOUZA, A.J.M.; LIMA, S.E.; ANDRADE, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Path.**, v. 78, p. 391-399, 1997.
- AVILA, L.F.C.; FONSECA, J.S.V.; DUTRA, G.F.; TELMO, P.L.; SILVA, A.M.W.A.; BERNE, M.E.A.; SILVA, P.E.A.; CONCEIÇÃO, F.R.; SCAINI, C.J. Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone in mice with visceral toxocariasis. **Parasitol Res**, v. 110, p. 443–447, 2012.
- BELL, A.; ROBERTS, H.C.; CHAPPELL, L.H. The Antiparasite Effects of cyclosporin a: possible drug targets and clinical applications. **Gen. Pharmac.**, v. 27, n. 6, p. 963-971, 1996.
- BRAZ, A.S.; ANDRADE, C.A.F.; MOTAD, L.M.H.; LIMA, C.M.B.L. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 4, p. 368–380, 2015.
- BRESSAN, A.L.; SILVA, R.S.; FONTENELLE, E.; GRIPP, A.C. Imunossupressores na dermatologia. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 1, p. 9-22, 2010.
- CARVALHO, E. A; ROCHA, R. L. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 2, p. 100-110, 2011.
- CHAPPELL, L.H.; WASTLING, J.M. Cyclosporin A: antiparasite drug, modulator of the host–parasite relationship and immunosuppressant. **Parasitology**, v. 105 (Suppl.), S25–S40, 1992.
- COLEBROOK, A.L.; JENKINS, D.D; LIGHTOWLERS, M.W. Anti-parasitic effect of cyclosporin A on *Echinococcus granulosus* and characterization of the associated cyclophilin protein. **Parasitology**, v. 125, p. 485-493, 2002.
- DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, v. 61, p.781-2, 1975.
- DIAS, S.R.C.; COSTA, A.F.D.V.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; ROATT, B.M.; FONSECA, K.S.; PAIVA, N.C.N.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; FUJIWARA, R.T.; RABELO, E.M.L. Prednisolone and cyclosporine A: Effects on an experimental model of ancylostomiasis. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1,p. 80–88, 2013.
- DZIK, J.M.; ZIELIJSKI, Z.; GOIOS, B.; WAIJATYS-RODE, E. *Trichinella spiralis* infection aVects p47phox protein expression in guinea-pig alveolar macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 112, p. 158–163, 2006.

EID, M.M.; EL-KOWRANY, S.I.; OTHMAN, A.A.; GENDY, D.I.E.; SAIED, E.M. Immunopathological changes in the brain of immunosuppressed mice experimentally infected with *Toxocara canis*. **Korean J Parasitol**, v. 53, n. 1, p. 51-58, 2015.

ENKO, K.; TADA, T.; OHGO, K. O.; NAGASE, S.; NAKAMURA, K.; OHTA, K.; ICHIBA, S.; UJIKE, Y. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with Visceral Larva Migrants caused by *Toxocara canis* infection. **Circ J**, v.73, n.7, p.1344–1348, 2009.

FAN, C. K.; LIAO, C. W.; CHENG, Y. C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 342–352, 2013.

FIALHO, P.M.; CORRÊA, C.R. A systematic review of toxocariasis: a neglected but high-prevalence disease in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, pii: 15-0733, 2016. doi: 10.4269/ajtmh.15-0733

FILLAUX, J.; MAGNAVAL, J.F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 327– 336, 2013.

FISHER, M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. **Trends Parasitol**, v.19, n.4, p.167–170, 2003

FISHMAN, J.A. Infections in Immunocompromised Hosts and Organ Transplant Recipients: Essentials. **Liver Transplantation**, v. 17, n. 11, Suppl 3, p. 34-37, 2011.

FOK, E.; KASSAI, T. *Toxocara canis* infection in the paratênico host: a study on the chemosusceptibility of the somatic larvae in mice. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 243-259, 1998.

GALVÁN, A.L.; AGUDELO, S.P.; RESTREPO, J.G.; TORO, F.; GALVIZ, L.A.; BOTERO, J. Efecto de la ciclosporina A en ratones C57BL/6 infectados con *Encephalitozoon intestinalis*. **Biomédica**, v. 26, p. 126-137, 2006.

GUILHERME, E.V.; MARCHIORO, A.A.; ARAUJO, S.M.; FALAVIGNA, D.L.M.; ADAMI, C.; FALAVIGNA-GUILHERME, G.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Toxocariasis in children attending a Public Health Service Pneumology Unit in Paraná State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 55 n. 3, p. 189-92, 2013.

LEITE, L.C.; CIRIO, S.M.; DINIZ, J.M.F.; MARINONI, L.P.; SILVA, A.W.C.; LUZ, E.; VARGAS, C.C.S.G.; LEITE, S.C. ZADOROSNEI, A.C.B.; VERONESI, E.M.; BARRANCO, R. Contaminação por ovos de *Toxocara* spp. em praças públicas e parques recreacionais (jardinetes) de Curitiba – Paraná – Brasil. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**, v.2, n.2, p. 59-64, 2004.

LEE, A.C.Y.; SCHANTZ, P.M.; KAZACOS, K.R.; MONTGOMERY, S.P.; BOWMAN, D.D. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends Parasitol**, v. 26, n.4, p. 155-161, 2010.

LESCANO, S.A.Z.; CHIEFFI, P.P.; IKAI, D.K.; RIBEIRO, M.C.S.A. Efeitos da ciclosporina A e betametasona na toxocaríase murina experimental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 22-24, 2004.

MAGALHÃES, L.A. **Resposta imunológica em camundongos com tríplice infecção com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes biotopos frente ao uso de imunossuppressores**. 2012. 91 f. (Mestrado em Patologia Humana). Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

MENDONÇA, L.R.; VEIGA, R.V.; DATTOLI, V.C.; FIGUEIREDO, C.A.; FIACCONE, R.; SANTOS, J.; CRUZ, Á.A.; RODRIGUES, L.C.; COOPER, P.J.; PONTES-DECARVALHO, L.C.; BARRETO, M.L.; ALCÂNTARA NEVES, N.M. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, n.11, e1886, 2012.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v.103, n.1-2, p.19-27, 2002.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **J Helminthol**, v. 75, n. 4, p. 299-305, 2001.

RIGANTI, J.; MAQUEDA, M.G.; PIÑERO, M.C.B.; VOLONTERI, V.I.; GALIMBERTI, R.L. Reactivation of Chagas disease: cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 7, p. 829–834, 2012.

RIZO-TOPETE, L.M.; ARTEAGA-MÜLLER, G.Y.; CRUZ-VALDEZ, C.; MARTÍNEZ-JÍMENEZ, J.G.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, C.; GUERRERO-GONZÁLEZ, E.; MORENO, R. Strongyloidosis, cause of multiple organ failure in patients with renal transplantation. **Adv Tech Biol Med**, v. 3, n. 3, 2015.

SANTOS-NETO, L.L.; POLCHEIRA, M.F.; CASTRO, C.; LIMA, R.A.C.; SIMAAN, C.K.; CORRÊA-LIMA, F.A. Alta parasitemia pelo *Trypanosoma cruzi* em paciente com lupus eritematoso sistêmico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, 2003.

SARIEGO, I.; KANOBANA, K.; ROJAS, L.; SPEYBROECK, N.; POLMAN, K.; NÚÑEZ, F.A. Toxocariasis in Cuba: a literature review. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, n. 2, e1382, 2012.

SINGH, B.B, SHARMA, R.; GILL, J.P. *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* and *Taenia solium* helminthozoonoses: seroprevalence among selected populations in north India. **J Parasit Dis.**, v. 39, n. 3, p.487-90, 2015.

SHARGHI, N.; SCHANTZ, P.M.; CARAMICO, L. BALLAS, K.; TEAGUE, B.A.; HOTEZ, P.J. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for

asthma: A clinic-based case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 111-116, 2001.

TINOCO-GRACIA, L.; BARRERAS-SERRANO, A.; LÓPEZ-VALENCIA, G.; TAMAYO-SOSA, A.R.; QUIROZ-ROMERO, H.; MELGAREJO, T. Seroprevalence of Larva Migrans of *Toxocara canis* and evaluation of associated risk factors among children in a Mexico-United States border region. **Intern J Appl Res Vet Med**, v. 6, n. 2, p. 130-136, 2008.

TRAVERSA, D.; REGALBONO, A.F.; CESARE, A.; TORRE, F.; DRAKE, J.; PIETROBELLI, M. Environmental contamination by canine geohelminths. **Parasites & Vectors**, 7:67, 2014.

WANG, G. X.; LUO, Z. J. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **J. Helminthol**, v.72, 1998.

5. Considerações finais

O tratamento com CsA (50 mg/Kg) exerceu um efeito imunossupressor em camundongos experimentalmente infectados por *T. canis*, comprovado pela maior intensidade de infecção de larvas recuperadas, contudo em dose menor (10 mg/Kg) tal efeito não foi observado.

Os níveis de anticorpos anti-*Toxocara* no 15º dia pós-inoculação, nos grupos tratados com CsA, foram menores que os do grupo controle, porém não houve diferença entre os três grupos no 30º dia. Também não houve correlação entre os níveis de anticorpos e o número de larvas recuperadas.

É importante o desenvolvimento de outras pesquisas que avaliem diferentes doses deste fármaco assim como diferentes períodos da infecção por *T. canis*. A CsA é um fármaco amplamente utilizado e os pacientes tratados devem ser advertidos quanto à possibilidade da toxocaríase assim como de outras parasitoses.

Referências

AMATO, J.G.P.; NETO, V.A.; AMATO, V.S.; DUARTE, M.I.S.; UIP, D.E.; BOULOS, M. Lesões cutâneas como únicas manifestações de reativação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em receptora de rim por transplante. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p.61-63, 1997.

ABDEL-HAFEEZ, E.H.; AHMAD, A.K.; ALI, B.A.; MOSLAM, F.A. Opportunistic parasites among immunosuppressed children in Minia District, Egypt. **Korean J Parasitol**, v. 50, n. 1, p.57-62, 2012.

ACURCIO, F.A.; SATURNINO, L.T.M.; SILVA, A.L.; OLIVEIRA, G.L.A.; ANDRADE, E.I.G.; CHERCHIGLIA, M.L.; CECCATO, M.G.B. Análise de custo-efetividade dos imunossupressores utilizados no tratamento de manutenção do transplante renal em pacientes adultos no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 29 Sup:S92-S109, 2013.

AIRES, W.O.; FRIAS, R.B.; PASCHOAL, G.R. Toxocaríase e larva migrans visceral. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 7, n.11, ISSN: 1679-7353, 2008.

AVILA, L.F.C.; FONSECA, J.S.V.; DUTRA, G.F.; TELMO, P.L.; SILVA, A.M.W.A.; BERNE, M.E.A.; SILVA, P.E.A.; CONCEIÇÃO, F.R.; SCAINI, C.J. Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone in mice with visceral toxocariasis. **Parasitol Res**, v. 110, p. 443–447, 2012.

BARRIGA, O. O. A critical look at the importance, prevalence and control of Toxocariasis and the possibilities of immunological control. **Vet Parasitol**, v. 29, p. 195-234, 1988.

BASS, J. L.; MEHTA, K. A.; GLICKMAN, L. T.; EPPES, B. M. Clinically inapparent *Toxocara* infection in children. **N Engl J Med**, v. 308, n. 12, p. 723-4, 1983.

BASSO, R.M.C.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; SOLIGO, D.S.; RIBACKI, S.I.; CALLEGARI-JACQUESII, S.M.; ZOPPASI, B.C.A. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS, 2008. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 3, p. 263-268, 2008.

BERNSTEEN, L.; GREGORY, C. R.; ARONSON, L. R.; LIRTZMAN, R. A.; BRUMMER, D. G. Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. **J. Am. Vet. Med. Ass**, v. 215, p 1123-1126, 1999.

BRAZ, A.S.; ANDRADE, C.A.F.; MOTAD, L.M.H.; LIMA, C.M.B.L. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais em pacientes com doenças reumáticas autoimunes. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 4, p. 368–380, 2015.

BRESSAN, A.L.; SILVA, R.S.; FONTENELLE, E.; GRIPP, A.C. Imunossupressores na dermatologia. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 1, p. 9-22, 2010.

BROUCKE, S.V.D.; KANOBANA, K.; POLMAN, K.; SOENTJENS, P.; VEKEMANS, M.; THEUNISSEN, C.; Vlieghe, E.; ESBROECK, M.V.; JACOBS, J.; ENDEN, E.V.D.; ENDE, J.V.D.; GOMPEL, A.V.; CLERINX, J.; BOTTIEAU, E. Toxocariasis Diagnosed in International Travelers at the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, from 2000 to 2013. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3: e0003559, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003559

BRUM, J.W.A.; CONCEIÇÃO, A.S.; GONÇALVES, F.V.C.; MAXIMIANO, L.H.S.; DINIZ, L.B.M.P.V.; PEREIRA, M.N.; SILVA, E.S. Parasitoses oportunistas em pacientes com o vírus da imunodeficiência humana. **Rev Bras Clin Med**, v. 11, n. 3, p. 280-288, 2013.

CARVALHO, E. A; ROCHA, R. L. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 2, p. 100-110, 2011.

CASTRO, M.C.R.; DEBONI, L.; ESMERALDO, R.M.; MATUK, T.A.; PACHECO, A.; SAITOVITCH, D.; SALOMÃO, A.; SILVA JUNIOR, H.T.; VILLAÇA, S. Use of Thymoglobulin® (antithymocyte immunoglobulin) in renal transplantation: practical guide. **J Bras Nefrol**, v. 37, n. 2, p.228-240, 2015.

CHIEFFI, P.P.; SANTOS, S.V.; QUEIROZ, M.L.; LESCANO, S.A.Z. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 51, n. 6, p. 301-308, 2009.

CHOI, D.; LIM, J.H.; CHOI, D.; LEE, K.S.; PAIK, S.W.; KIM, S.H.; CHOI, Y.; HUH, S. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: A cross-sectional study in healthy adults. **Korean J Parasitol**, vol. 50, n. 1, p. 23-27, 2012.

DARANI, H.Y.; YOUSEFI, H. Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy. **Future Oncol.**, v. 8, n. 12, p.1529–1535, 2012.

DELGADO, O.; RODRÍGUEZ-MORALES, A.J. Aspectos clínico-epidemiológicos de la toxocariasis: una enfermedad desatendida en Venezuela y América Latina, **Boletín de Malariología Y Salud Ambiental**, v. 49, n.1, p. 1-39, 2009.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clin Microbiol Rev**, v.16, n.2, p.265-272, 2003.

DIAS, S.R.C.; COSTA, A.F.D.V.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; ROATT, B.M.; FONSECA, K.S.; PAIVA, N.C.N.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; FUJIWARA, R.T.; RABELO, E.M.L. Prednisolone and cyclosporine A: Effects on an

experimental model of ancylostomiasis. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 80–88, 2013.

ENKO, K.; TADA, T.; OHGO, K. O.; NAGASE, S.; NAKAMURA, K.; OHTA, K.; ICHIBA, S.; UJIKE, Y. Fulminant eosinophilic myocarditis associated with Visceral Larva Migrants caused by *Toxocara canis* infection. **Circ J**, v.73, n.7, p.1344–1348, 2009.

FAN, C. K.; LIAO, C. W.; CHENG, Y. C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 342–352, 2013.

FERREIRA, M.S. Infections by Protozoa in immunocompromised hosts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, suppl. I, p. 159-162, 2000.

FERREIRA, C.M.; BARBOSA, N.S.; FERREIRA, W.A.; SOUZA, R.L.; NEVES, M.A.; CARVALHO, A.L.; BARBOSA, M.G.V. Infecção pulmonar por *Strongyloides stercoralis* em paciente tratado com imunossupressores. **Ver Pat Trop**, v. 37, n. 3, p.275-280, 2008.

FIGUEIREDO, S.D.P.; TADDEI, J. A. A. C.; MENEZES, J. J. C.; NOVO, N. F.; SILVA, E. O. M.; CRISTOVÃO, H. L. G.; CURY, M. C. F. S. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **Jornal de Pediatria**, v.81, n.2, p.126-132, 2005

FILLAUX, J.; MAGNAVAL, J.F. Laboratory diagnosis of human toxocaríasis. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 327– 336, 2013.

FISHER, M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. **Trends Parasitol**, v.19, n.4, p.167–170, 2003

FISHMAN, J.A. Infections in Immunocompromised Hosts and Organ Transplant Recipients: Essentials. **Liver Transplantation**, v. 17, n. 11, Suppl 3, p. 34-37, 2011.

FU, C.; CHUANG, T.; LIN, H.; WU, C.; LIU, H.; LANGINLUR, M.K.; LU, M.; HSIAO, W.W.; FAN, C. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, v. 261, n. 14, p. 1-7, 2014.

GARCIA, S.C.; LOPES, L.S.; SCHOTT, K.K.; BECK, S.T.; POMBLUM, V.J. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.

GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.H.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, A.C.; SILVA, F.N.; MATIA, V.L.T.; DHOM-LEMOSSA, L.C.; BARBOSA, F.S.; PASSOS, L.S.A.; GAZE, S.; CARNEIRO, C.M.; BARTHOLOMEU, D.C.; BUENO, L.L.; FUJIWARA, R.T. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. **International Journal for Parasitology**, v.43, n. 9, p. 697–706, 2013.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M.; CYPESS, R. H. Canine and Human

toxocariasis: Review of transmission, pathogenesis, and clinical disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 175, n. 12, 1979.

GLICKMAN, L. T.; MAGNAVAL, J. F.; DOMANSKI, L. M.; SHOFER, F. S.; LAURIA, S. S.; GOTTSTEIN, B.; BROCHIER, B. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? **Am J Epidemiol**, v. 125, n. 6, p. 1019-34, 1987.

GONZALES, W.H.R. **Deglicosilação de antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* e a sua aplicação no sorodiagnóstico da toxocaríase humana.** 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GRAMA, F.D.; LESCANO, S.Z.; MOTA, K.C.P.; PULTZ, B.A.; MIRANDA, J.S.; SEGUNDO, G.R.S.; TAKETOMI, E.A.; FERNANDES, K.P.; LIMONGI, J.E.; PAULA, F.M.; CHIEFFI, P.P.; CURY, M.C. Seroprevalence of *Toxocara* spp. In children with atopy, **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 2014. doi:10.1093/trstmh/tru165

GUERRA JUNIOR, A.A.; ACÚRCIO, F.A.; ANDRADE, E.I.G.; CHERCHIGLIA, M.L.; CESAR, C.C.; QUEIROZ, O.V.; SILVA, G.D. Ciclosporina versus tacrolimus no transplante renal no Brasil: uma comparação de custos. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p.163-174, jan, 2010

GYANG, P.V.; AKINWALE, O.P.; LEE, Y.; CHUANG, T.; OROK, A.B.; AJIBAYE, O.; LIAO, C.; CHEN, P.; CHOU, C.; HUANG, Y.; BARGHOUTH, U.; FAN, C. Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko, an urban slum community in Nigeria, **Acta Trop**, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.018>

HUNTER, P. R.; NICHOLS, G. Epidemiology and clinical features of Cryptosporidium infection in immunocompromised patients. **Clin. Microbiol.** v. 15, n.1, p. 145–154, 2002.

KATAGIRI, S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 406–413, 2008.

KRAMER, F.; HAMMERSTEIN, R.; STOYE, M.; EPE, C. Investigations into the prevention of prenatal and lactogenic *Toxocara canis* infections in puppies by application of moxidectin to the pregnant dog. **J. Vet. Med**, v.53, n.5, p.218-223, 2006.

LALLO, M.A.; HIRSCHFELD, M.P.M. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. **Experimental Parasitology**, v. 131, p.339–343, 2012.

LEE, A.C.Y.; SCHANTZ, P.M.; KAZACOS, K.R.; MONTGOMERY, S.P.; BOWMAN, D.D. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends Parasitol**, v. 26, n.4, p. 155-161, 2010.

LEE, R.M.; MOORE, L.B.; BOTTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J. Toxocariasis in North America: A Systematic Review, **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.8: e3116, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003116

LESCANO, S.A.Z.; CHIEFFI, P.P.; IKAI, D.K.; RIBEIRO, M.C.S.A. Efeitos da ciclosporina A e betametasona na toxocaríase murina experimental. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 22-24, 2004.

LI, L.; GAO, W.; YANG, X.; WU, D.; BI, H.; ZHANG, S.; HUANG, M.; YAO, X. Asthma and toxocariasis, **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 113, p. 187-192, 2014.

LIN-WANG, H.T.; MANRIQUE, R. Aplicação da técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT) para dosagem de ciclosporina na amostra de sangue absorvido em papel-filtro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 7-12, 2002.

LOUKAS, A.; DOEDENS, A.; HINTZ, M.; MAIZELS, R.M. Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. **Parasitology**, v. 121, n. 5, p. 545-554, 2000.

MACOVIK, J. A., OYER, P. E., STINSON, E. B. Four-year experience with cyclosporine for heart and heart-lung transplantation. **Transplant.**, v. 17, p.97-101, 1985.

MAGALHÃES, L.A. **Resposta imunológica em camundongos com tríplice infecção com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes biotopos frente ao uso de imunossupressores**. 2012. 91 f. (Mestrado em Patologia Humana). Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

MAIZELS, R.M.; DE SAVIGNY, D.; OGILVIE, B.M. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, v. 6, p.23-37, 1984.

MATSUZAWA, K.; NAKAMURA, F.; ABE, M.; OKAMOTO, K. Immunosuppressive and antiparasitic effects of cyclosporin A on *Hymenolepis nana* infection in mice. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 579-588, 1998.

MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONED, R. L.; 1 PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPER, P.; BARRETO, M. B.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from 3 an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, 2013.

MIKHAEL, N. Z.; MONTPETIT, V. J.; ORIZAGA, M.; ROWSELL, H. C.; RICHARD, M. T. *Toxocara canis* infestation with encephalitis. **Can J Neurol Sci**, v. 1, n. 2, p. 114-20, 1974.

MORII, K.; ODA, T.; SATOH, H.; KIMURA, Y.; AOYAMA, Y.; FUJIWARA, Y.; HIRAMATSU, Y.; OKUSHIN, H.; UESAKA, K.; NAKAMURA, S. *Toxocara canis*-associated visceral larva migrans of the liver. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 30, p. 148–149, 2015.

MOURA, M.Q., JESKE, S., VIEIRA, J.N., CORRÊA, T.G., BERNE, M.E.A., VILLELA, M.M. Frequency of geohelminths in public squares in Pelotas, RS, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 175-178, 2013.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T.B.; NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v.103, n.1-2, p.19-27, 2002.

OLIVOS-GARCÍA, A.; CARRERO, J.C.; RAMOS, E.; NEQUIZ, M.; TELLO, E.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R. Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 82, p. 310–315, 2007.

OVERGAUW, P.A.M. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. **Crit Rev Microbiol**. v. 23, p. 233-251, 1997.

PAES, N.A.; SILVA, L.A.A. Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 6, n. 2, p. 99-109, 1999.

PARK, S.Y., GLASER, C., MURRAY, W.J., KAZACOS, K.R., ROWLEY, H.A., FREDRICK, D.R., BASS, N. Raccoon roundworm (*Baylisascaris procyonis*) encephalitis: case report and field investigation. **Pediatrics**, v. 106, E.56, 2000.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **J Helminthol**, v. 75, n. 4, p. 299-305, 2001.

PERLMAN, J.E.; KAZACOS, K.R.; IMPERATO, G.H.; DESAI, R.U.; SCHULMAN, S.K.; EDWARDS, J.; PONTRELLI, L.R.; MACHADO, F.S.; TANOWITZ, H.B.; SAFFRA, N.A. *Baylisascaris procyonis* neural larva migrans in an infant in New York city. **J. Neuroparasitol**, v.1, n.5, 2010.

REZENDE, J.M. Imunodepressão, imunossupressão. **Linguagem médica**, v. 40, n. 2, p. 199-201, 2011.

RIGANTI, J.; MAQUEDA, M.G.; PIÑERO, M.C.B.; VOLONTERI, V.I.; GALIMBERTI, R.L. Reactivation of Chagas disease: cutaneous manifestations in two immunosuppressed patients. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 7, p. 829–834, 2012.

ROLDÁN, W.H., ESPINOSA, Y.A. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 3, p. 411-418, 2009.

ROLDÁN, W.H.; ESPINOZA, Y.A.; HUAPAYA, P.E.; JIMÉNEZ, S. Diagnóstico de la toxocarosis humana. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 613-620, 2010.

RÓLDAN, W.H.; RUBINSKY-ELEFANT, G. Immunodiagnosis of Human Toxocariasis, Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases, Dr. Moslih Al-Moslih (Ed.), ISBN: 978-953-51-0370-7, **InTech**, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/serological-diagnosis-of-certain-human-animal-and-plant-diseases/immunodiagnosis-of-human-toxocariasis>, 2012.

ROSSACK, J.; RICKETTS, P.; TE, H.S.; HART, J. A case of adult hepatic toxocariasis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 6, p. 344-348, 2008.

RUBINSKY-ELEFANT, G.; HIRATA, C. E.; YAMAMOTO, J. H.; FERREIRA, M. U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 104, n. 1, p. 3-23, 2010.

SANTARÉM, V.A.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; CHESINE, P.A.F.; LELI, F.N.C. Toxocaríases canina e humana. **Vet. e Zootec.**, p.437-447, v.16, n.3, 2009.

SANTOS, D.F.C. **Toxocarose: um problema para a saúde humana nas zonas urbanas**. 2012. 44 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2012.

SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G.; FERNANDES, N.A.; OLIVEIRA, J.A.A. Parasitic and intestinal commensals in the neoplastic patients undergoing chemotherapy. **Biosci. J.**, v. 27, n. 1, p. 170-177, 2011.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J.F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. M. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasitol**, v. 25, p. 182–188, 2009.

SOUZA, R.F.; DATTOLI, V.C.C.; MENDONÇA, L.R.; JESUS, J.R.; BAQUEIRO, T.; SANTANA, C.C.; SANTOS, N.M.; BARROUIN-MELO, S.M.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Prevalência e fatores de risco da infecção humana por *Toxocara canis* em Salvador, Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 516-519, 2011.

SCHOENARDIE, E. R.; SCAINI, C. J.; BROD, C. S.; PEPE, M. S.; VILLELA, M. M.; MCBRIDE, A. J. A.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A. Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. *Journal of Parasitology*, v. 99, n. 3, p. 537-539, 2013.

STRUBE, C., HEUER, L., JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**, 193, p. 375–389, 2013.

TAIRA, K.; SAEED, I.; PERMIN, A.; KAPEL, C.M.O. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 115–124, 2004.

TAYLOR, A.L.; WATSON, C.J.E.; BRADLEY, J.A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, p. 23–46, 2005.

TERTO, W.D.S., OLIVEIRA, R.G., LIMA, M.M. Avaliação parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa* L.) comercializadas em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil. **Vig Sanit Debate**, v. 2, n. 3, p. 51-57, 2014.

TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BARERA, A.; DIELI, F.; SIRECI, G.; GENCHI, C.; DEPLAZES, P.; SALERNO, A. *Toxocara canis* infection induces antigen-specific IL-10 and IFN γ production in pregnant dogs and their puppies. **Vet Immunol Immunopathol**, v.108, n.1-2, 2005.

TRAVERSA, D.; REGALBONO, A.F.; CESARE, A.; TORRE, F.; DRAKE, J.; PIETROBELLI, M. Environmental contamination by canine geohelminths. **Parasites & Vectors**, 7:67, 2014.

VIEIRA, J.N.; PEREIRA, C.P, BASTOS, C.G.G.; NAGEL, A.S.; ANTUNES, L.; VILLELA, M.M. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.1, p.45-49, 2013.

VILLARINHO, M.V.; PADILHA, M.I.; BERARDINELLI, L.M.M.; BORENSTEIN, M.S.; MEIRELLES, B.H.S.; ANDRADE, S.R. Políticas públicas de saúde face à epidemia da AIDS e a assistência às pessoas com a doença. **Rev Bras Enferm**, v. 66, n. 2, p. 271-277, 2013.

WALDMAN, E.A.; SILVA, L.J.; MONTEIRO, C.A. Trajetória das doenças infecciosas: da eliminação da poliomielite à reintrodução da cólera. **Inf. Epidemiol. Sus**, v. 8, n. 3, p. 05-47, 1999.

WALSH, M. G.; HASEEB, M. A. Small-Area Estimation of the Probability of Toxocariasis in New York City Based on Sociodemographic Neighborhood Composition. **PLoS ONE**, v.9, n.6, e99303. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0099303

YOSHIDA, H.; ENDO, H.; TANAKA, S.; ISHIKAWA, A.; KONDO, H.; NAKAMURA, T. Recurrent paralytic ileus associated with strongyloidiasis in a patient with systemic lupus erythematosus. **Mod Rheumatol**. v. 16, n. 44, 2006.

ANEXOS

I - Número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas em órgãos e musculatura esquelética em camundongos Swiss albino experimentalmente infectados

Grupo 1 - Ciclosporina 10 mg/Kg

	Fígado	Pulmões	Encéfalo	Rins	Coração	Musculatura	Olhos	Total
Animal 1	6	5	43	1	2	25	0	82
Animal 2	12	5	91	2	4	16	0	130
Animal 3	7	4	51	2	3	15	1	83
Animal 4	18	5	86	1	1	15	0	126
Animal 5	14	2	27	1	0	8	1	53
Animal 6	0	7	30	2	1	12	0	52
Animal 7	20	8	143	2	0	14	0	187
Animal 8	13	6	56	2	3	14	1	95
Animal 9	6	1	31	2	0	15	0	55
Animal 10	9	1	51	2	1	22	0	86

Grupo 2 - Ciclosporina 50 mg/Kg

	Fígado	Pulmões	Encéfalo	Rins	Coração	Musculatura	Olhos	Total
Animal 1	12	12	138	2	3	35	1	203
Animal 2	32	14	118	2	4	35	1	206
Animal 3	39	7	120	1	1	51	0	219
Animal 4	24	4	56	0	1	23	2	110
Animal 5	33	10	126	0	1	18	0	188
Animal 6	8	6	125	0	2	36	1	178
Animal 7	27	13	151	3	6	36	0	236
Animal 8	16	8	148	0	1	36	0	209
Animal 9	24	13	128	1	1	28	1	196
Animal 10	25	10	115	1	1	39	1	192

Grupo 3 - Controle (Sem imunossupressão)

	Fígado	Pulmões	Encéfalo	Rins	Coração	Musculatura	Olhos	Total
Animal 1	16	1	96	0	1	10	0	124
Animal 2	14	4	51	0	1	8	0	78
Animal 3	17	3	60	1	2	14	0	97
Animal 4	9	8	70	3	2	34	0	126
Animal 5	10	3	75	1	0	20	1	110
Animal 6	23	3	66	1	0	16	1	110
Animal 7	19	12	123	0	1	51	1	207
Animal 8	7	4	69	0	0	20	0	100
Animal 9	3	5	39	1	0	34	0	82
Animal 10	9	9	93	2	1	26	1	141

II – Níveis de anticorpos anti-*Toxocara* (soroconversões)

G1 - Ciclosporina 10mg/Kg

	Dia zero	Dia 15	Dia 30
Animal1	0,0245	0,3035	0,2365
Anima2	0,047	0,304	0,275
Animal3	0,069	0,2725	0,2915
Animal4	0,0215	0,293	0,4075
Animal5	0,0375	0,303	0,363
Animal6	0,029	0,324	0,344
Animal7	0,082	0,489	0,3615
Animal8	0,0295	0,335	0,282
Animal9	0,044	0,355	0,318
Animal10	0,006	0,334	0,4065

G2 - Ciclosporina 50mg/Kg

	Dia zero	Dia 15	Dia 30
Animal1	0	0,345	0,361
Anima2	0,077	0,39	0,3335
Animal3	0,0825	0,311	0,2385
Animal4	0,0735	0,3525	0,3105
Animal5	0,034	0,2895	0,2565
Animal6	0,069	0,3445	0,301
Animal7	0,031	0,246	0,242
Animal8	0,0985	0,2265	0,3055
Animal9	0,0945	0,222	0,245
Animal10	0,0975	0,1885	0,2135

G3 – Controle (sem imunossupressão)

	Dia zero	Dia 15	Dia 30
Animal1	0,077	0,1395	0,248
Anima2	0,0645	0,2725	0,434
Animal3	0,0685	0,2685	0,371
Animal4	0,0685	0,1295	0,3445
Animal5	0,069	0,158	0,2765
Animal6	0,088	0,1155	0,298
Animal7	0,032	0,1765	0,348
Animal8	0,075	0,3085	0,418
Animal9	0,082	0,3025	0,2855
Animal10	0,0785	0,2025	0,305