

Recuperação de larvas de *Toxocara canis* de tecidos de camundongo

Recovery of *Toxocara canis* larvae from mouse tissue

Cáris Maroni NUNES¹; Saemi OGASSAWARA²

CORRESPONDENCE TO:
Cáris Maroni Nunes
Departamento de Apoio, Produção e
Saúde Animal
Faculdade de Odontologia da
UNESP
Rua Clóvis Pestana, 793
16050-680 - Araçatuba - SP - Brasil

1 - Departamento de Apoio,
Produção e Saúde Animal -
Faculdade de Odontologia da
UNESP - Araçatuba
2 - Departamento de Medicina
Veterinária Preventiva e Saúde
Animal - Faculdade de
Medicina Veterinária e
Zootecnia - USP

RESUMO

Foram avaliadas duas técnicas de recuperação de larvas de *Toxocara canis* em hospedeiro paratênico: digestão enzimática e homogeneização. Vinte camundongos foram oralmente inoculados com 1.000 ovos de *Toxocara canis*; após 44-46 horas procedeu-se à recuperação das larvas do parasito no fígado e pulmões dos animais. O fígado apresentou maior número de larvas quando comparado aos pulmões. A técnica de homogeneização, quando comparada à técnica de digestão, revelou-se mais eficiente para a recuperação de larvas, independentemente do órgão avaliado.

UNITERMOS: *Toxocara canis*; Larva migrans visceral; Larvas; Camundongos; Tecidos de animal; Técnica; Recuperação.

INTRODUÇÃO

A Larva migrans visceral (LMV), síndrome clínica decorrente da migração somática de larvas de nematóides em humanos, tem sido reconhecida como um problema emergente em saúde pública (Schantz; Glickman⁹, 1983).

Com o intuito de conhecer melhor aspectos relacionados com a patogenia, imunologia e terapêutica dessa síndrome, vários estudos têm sido realizados em hospedeiros paratênicos.

A infecção experimental de camundongos com *Toxocara canis* constitui um dos melhores modelos biológicos para o estudo da Larva migrans visceral (Piergili *et al.*⁸, 1989); a recuperação de larvas desse parasito nos diferentes tecidos é um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a intensidade, a distribuição e outros aspectos relacionados com a infecção. Diferentes técnicas de recuperação baseadas na liberação mecânica da larva associada à digestão de tecidos têm sido recomendadas^{1,2,7}.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desempenho de uma técnica baseada na homogeneização para a liberação mecânica das larvas presentes em tecidos, utilizando-se o camundongo como hospedeiro paratênico.

MATERIAL E MÉTODO

Vinte camundongos (Suíço albino) com idades entre 30 e 40 dias e peso médio de 30 gramas foram inoculados, com auxílio de agulha de ponta romba, por via intragástrica, com uma suspensão fecal contendo 1.000 ovos de *Toxocara canis* (volume de 0,3-0,4 ml), os quais apresentavam em seu interior a larva infectante. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados com ração comercial. Como grupo-controle, utilizaram-se 4 camundongos que foram tratados em iguais condições.

Após um período de 44 a 46 horas da inoculação, os animais

foram sacrificados com éter sulfúrico, para a retirada do fígado e pulmões, e foram submetidos a uma das técnicas citadas a seguir, utilizando-se 10 animais para cada técnica:

A- Digestão com solução ácida de pepsina 1% (Sprent¹⁰, 1952, modificada por Moreira⁶, 1972)

Pulmões e fígado colocados separadamente em placas de Petri, adicionados de solução fisiológica 0,85% e fragmentados com tesoura e bisturi. Adicionou-se igual volume de solução ácida de pepsina a 1% (pH = 1,5) e, após mistura adequada, incubou-se a 37°C por 3 horas. Passado este período procedeu-se à coagem, em coador de chá e adicionou-se solução fisiológica, para se obter um volume final de 50 ml. O coado, acondicionado em tubo cônico, foi centrifugado a 700 g por 10 minutos; o sobrenadante foi descartado e o volume de 1 ml do sedimento foi examinado entre lâmina e lamínula, ao microscópio óptico com aumento de 100 x, para a observação de larvas.

B-Homogeneização

Os órgãos retirados dos animais foram adicionados de 30 ml de solução fisiológica e submetidos a trituração em homogeneizador de tecido (Omni Mixer - Sorvall), a 2.000 rpm por minuto, para que houvesse a liberação das larvas dos tecidos. Após a passagem em coador, ajustou-se o volume para 50 ml e procedeu-se da maneira acima descrita.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados observados foram normalizados para posterior análise estatística, tendo sido usada a transformação $\sqrt{n^o \text{ de larvas} + 0,50}$. Para avaliar as diferenças no número de larvas recuperadas segundo as diferentes técnicas e tecidos, utilizou-se Análise de Variância a dois critérios e, posteriormente, o Teste de Tukey. Adotou-se um nível de significância igual a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de larvas recuperadas após a realização de cada uma das técnicas descritas e para cada um dos órgãos avaliados pode ser observado na Tab. 1, juntamente com as medidas de posição: média (x) e desvio padrão (s). Nos animais do grupo-controle não foi observada presença de larvas nos órgãos avaliados.

Os resultados obtidos permitem observar que o fígado, quando comparado aos pulmões, apresentou número médio de larvas maior, o qual foi estatisticamente significativo ($P < 0,05$), independentemente da técnica empregada.

O maior número de larvas recuperadas a partir do tecido hepático está de acordo com as observações de Oshima⁷ (1961), o qual observou que, no período de 44-48 horas pós-inoculação, a maioria das larvas de *Toxocara canis* se encontrava no fígado e,

secundariamente, nos pulmões.

Comparando-se a técnica de homogeneização com a técnica de digestão, observa-se que o número médio de recuperação de larvas foi maior e estatisticamente significativo ($P < 0,05$) quando se utilizou a técnica de homogeneização, independentemente do órgão avaliado, revelando-se, portanto, mais eficiente para a recuperação de larvas.

Além de ser uma técnica de maior praticidade e de fácil execução, é menos custosa, já que não exige o uso de enzimas digestivas, razão pela qual sugerimos o uso em estudos que avaliem aspectos relacionados à infecção de *Toxocara canis*, baseando-se na recuperação de larvas de órgãos de camundongos, particularmente naqueles cuja análise é feita nos primeiros dias pós-infecção quando ainda não há intensa reação do hospedeiro, sendo mais fácil a liberação mecânica das larvas.

Tabela 1

Número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas segundo os órgãos avaliados e a técnica empregada. São Paulo, 1995.

Técnica de digestão			Técnica de homogeneização		
Nº animal	Fígado	Pulmão	Nº animal	Fígado	Pulmão
1	10	6	11	14	10
2	20	0	12	50	0
3	10	3	13	33	13
4	3	3	14	63	0
5	16	6	15	36	10
6	6	3	16	23	3
7	16	0	17	16	6
8	10	6	18	30	10
9	6	0	19	0	6
10	10	0	20	0	0
\bar{X}	10,70	2,70	\bar{X}	27,50	5,80
s	5,25	2,62	s	19,06	4,87

\bar{X} = Média aritmética

s = Desvio padrão

SUMMARY

Two techniques, peptic digestion and homogenization, were tested for the recovering of *Toxocara canis* larvae from mice tissue. Twenty mice were fed 1.000 embryonated eggs, and after 44-46 hours the animals were euthanised and liver and lungs were evaluated for the presence of larvae. Recovery rate from liver was greater than from lungs. Homogenization technique resulted in better percentage of larvae recovered, regardless of the organ evaluated.

UNITERMS: *Toxocara canis*; Larva migrans visceral; Larvae; Mouse; Animal tissues; Recovery; Techniques.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Sílvia Helena Venturoli Perri (UNESP-Araçatuba), pela análise estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-ABO-SHEHADA, M.N.; AL-ZUBAIDY, B.A.; HERBERT, I.V. The migration of larval *Toxocara canis* in mice. I- Migration through the intestine in primary infection. *Veterinary Parasitology*, v.17, n.1, p.65-73, 1984.

2-ABO-SHEHADA, M.N.; AL-ZUBAIDY, B.A.; HERBERT, I.V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice. *Veterinary Parasitology*, v.38, n.4, p.289-98, 1991.

3-CONCEPTION, J.E.; BARRIGA, O.O. Transfer of infection-induced immune protection to *Toxocara canis* infection in a mouse model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.9, n.4, p.371-82, 1985.

4-DELGADO, O.; BOTTO, C.; MATTEI, R.; ESCALANTE, A. Effect of albendazol in experimental toxocariasis of mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.83, n.6, p.621-4, 1989.

5-LEE, H.E. Effects of superinfection on the behaviour of *Toxocara canis* larvae in mice. *Journal of Parasitology*, v.46, n.5, p.583-8, 1960.

- 6-MOREIRA, A.A.B. **Aspectos imunopatológicos da Larva migrans visceral causada por *Toxocara canis***. São Paulo, 1972. 104p. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- 7-OSHIMA, T. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. **Journal of Parasitology**, v. 47, n.4, p.652-6, 1961.
- 8-PIERGILI FIORETTI, D.; MORETTI, A.; MUGHETTI L.; BRUSCHI, F. Eosinophilia, granuloma formation, migratory behaviour of second larvae stage in murine *Toxocara canis* infection - effect of the inoculum size. **Parassitologia**, v. 31, p.153-66, 1989.
- 9-SCHANTZ, P.M.; GLICKMAN, L.T. Ascarids of dogs and cats: a problem of public health and veterinary medicine. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.94, n.6, p.571-86, 1983.
- 10-SPRENT, J.F.A. On the migratory behaviour of the larvae of various Ascaris species. **Journal of Infectious Diseases**, v.90, p.165-76, 1952.