

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Dissertação

**Efeito *in vitro* e *in vivo* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre larvas
de *Toxocara canis***

Débora Liliane Walcher

Pelotas, 2015

Débora Liliane Walcher

**Efeito *in vitro* e *in vivo* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre larvas de
*Toxocara canis***

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos James Scaini

Pelotas, 2015

Catálogo na fonte
Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

W7111e Walcher, Débora Liliane

Efeito *in vitro* e *in vivo* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre larvas de *Toxocara canis* / Debora Liliane Walcher ; Carlos James Scaini, orientador. — Pelotas, 2015.

43 f.: il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Larva migrans visceral 2. Probióticos 3. Intensidade de I. Scaini, Carlos James, orient.II. Título.

CDD : 599.323

Universidade Federal de Pelotas

Débora Liliane Walcher

Efeito *in vitro* e *in vivo* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre larvas de
Toxocara canis

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências com ênfase em Parasitologia pelo Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

Data da Defesa: 26/03/2015

Banca examinadora:

Dr^a. Luciana Farias da Costa Avila

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela

Prof^a. Dr^a. Vanusa Pousada da Hora

Prof. Dr. Carlos James Scaini
(Orientador)

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia – Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG), em especial ao Laboratório de Parasitologia/FAMED, por possibilitarem a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos James Scaini, meu orientador e amigo, agradeço pela oportunidade, apoio, a confiança em mim depositada, e pelos seus ensinamentos.

Aos colegas e técnicos do laboratório de Parasitologia/ FAMED-FURG, pela amizade, apoio nos momentos de dificuldades e por contribuírem com o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

A Dra. Paula de Lima Telmo e Me. Luis Augusto Xavier Cruz, os quais foram essenciais para a realização deste trabalho, agradeço por todo apoio, incentivo e ensinamentos.

Aos meus pais, Milton e Fátima, minha irmã Vanessa e meu querido avô Oswaldo, pelo amor incondicional, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

Ao meu namorado Geovani Aldrighi, pela paciência, compreensão, carinho e principalmente pelo apoio em todas as minhas decisões.

WALCHER, Débora Liliane. **Efeito *in vitro* e *in vivo* do *Lactobacillus rhamnosus* sobre larvas de *Toxocara canis***. 2015. 43f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Resumo

A toxocaríase visceral é uma zoonose parasitária negligenciada mundialmente, cujo controle é difícil, pela complexidade da biologia do nematoide *Toxocara canis*, principal agente etiológico e o tratamento com fármacos tem eficácia moderada. Estudos experimentais com probióticos têm apresentado resultados promissores para o controle desta parasitose, porém existe a necessidade de ser testado um probiótico que seja facilmente administrado e seguro para o consumo humano. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 sobre a carga parasitária em camundongos BALB/c com toxocaríase aguda. Dois grupos (G) foram formados por 10 camundongos, sendo que os do G1 receberam o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, na concentração de 1.10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), por sonda intragástrica (IG), durante 15 dias pré-inoculação e dois dias pós-inoculação de 100 ovos embrionados de *T. canis*, pela via IG. Os camundongos do G2 (controle) receberam, diariamente, meio de cultivo estéril de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), pela mesma via de administração, durante o mesmo período do G1. A avaliação consistiu na quantificação de larvas recuperadas pela técnica de digestão tecidual de órgãos e musculatura esquelética estriada. Enquanto que o teste *in vitro* do probiótico foi realizado nas concentrações 1.10^6 , 1.10^7 , 1.10^8 , 1.10^9 UFC com 100 larvas por orifício em placa de microcultivo (triplicata). A administração do probiótico reduziu a carga parasitária de larvas de *T. canis* em 53,3% ($p=0,0018$) na fase inicial da infecção em camundongos. No teste *in vitro*, o probiótico não apresentou ação direta sobre larvas de *T. canis*, sendo que 89,3% a 93,5% das larvas permaneceram viáveis nas diferentes concentrações avaliadas. Estes resultados mostram o potencial do probiótico *L.rhamnosus* ao promover redução da carga parasitária de larvas de *T. canis* em camundongos, sendo importante estudar os mecanismos de ação promovidos por este probiótico.

Palavras chave: Larva *migrans* visceral; probióticos; intensidade de infecção

WALCHER, Débora Liliane. ***In vitro* and *in vivo* effect of *Lactobacillus rhamnosus* on *Toxocara canis* larvae**. 2015. 43f. Master's Thesis (Masters in Parasitology) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Abstract

Visceral toxocariasis is a parasitic zoonosis worldwide neglected, whose control is difficult, by the complexity of nematode biology *Toxocara canis*, main etiologic agent and the treatment with drugs have moderated efficacy. Experimental studies with probiotics have shown promising results to control this parasitosis, but there is necessity to test a probiotic that is easily administered and safe for human consumption. This study aimed to evaluate the effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on the parasite load in BALB/c mice with acute toxocariasis. Two groups (G) were formed by 10 mice, as G1 received probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 at a concentration of 1.10^9 colony forming units (CFU), by intragastric gavage (IG), 15 days pre-inoculation and two days after the inoculation of 100 *T. canis* eggs, via IG. The mice of G2 (control) received daily sterile culture medium de Man, Rogosa and Sharpe (MRS), by the same administration route, and during the same period of G1. The Evaluation consisted in quantifying the larvae recovered by tissue digestion technique of organs and skeletal striated muscle. While the *in vitro* test of probiotic was realized in the concentrations 1.10^6 , 1.10^7 , 1.10^8 , 1.10^9 UFC 100 larvae per hole of the microculture plate (triplicated). The administration of probiotics reduced the parasite load of *T. canis* larvae in 53.3% ($p = 0.0018$) in the early stage of infection in mice. In the *in vitro* test, probiotic showed no direct effect on larvae of *T. canis*, and 89.3% to 93.5% of the larvae remain viable at different concentrations. These results show the potential of probiotic *L. rhamnosus* in promoting the reduction of parasite load of *T. canis* larvae in mice, it is important to study the action mechanism of this probiotic.

Key Words: Visceral larva *migrans*; probiotics; infection intensity

Lista de tabelas

Tabela 1	Redução média do número de larvas de <i>Toxocara canis</i> em camundongos com toxocaríase aguda (48 horas de infecção), tratados com o probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (n=10)	24
Tabela 2	Percentual médio de larvas de <i>Toxocara canis</i> viáveis submetidas as diferentes concentrações de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	24

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2 .OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. Toxocaríase humana	12
3.2. Dificuldades do controle da toxocaríase humana	14
3.3. Probióticos.....	15
3.4. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16
4. ARTIGO	18
4.1. INTRODUÇÃO	20
4.2. METODOLOGIA.....	21
4.2.1. Obtenção e incubação de ovos de <i>Toxocara canis</i>	21
4.2.2. Probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	21
4.2.3. Delineamento experimental do estudo <i>in vivo</i>	22
4.2.4. Avaliação <i>in vitro</i> do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	22
4.2.5. Análise Estatística	23
4. 3. RESULTADOS.....	23
4.4. DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS	27
5. CONCLUSÕES GERAIS	31
6. REFERÊNCIAS	32
APÊNDICES.....	40

1. INTRODUÇÃO

A síndrome da larva *migrans* visceral (LMV) é caracterizada pela migração e persistência de larvas de helmintos em tecidos de hospedeiros não habituais (BEAVER, 1969). Esta parasitose tecidual é uma das infecções parasitárias mais prevalentes em todo o mundo (RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010), com taxas mais elevadas em países em desenvolvimento (MEJIA *et al.*, 2014), sendo a helmintose mais frequente em países industrializados (HOTEZ & WILKINS, 2009).

A prevalência da LMV ou toxocaríase humana está subestimada mundialmente devido a limitações dos métodos laboratoriais de diagnóstico e a sintomatologia inespecífica da parasitose (SMITH *et al.*, 2009). Assim, a toxocaríase tem sido considerada uma das doenças negligenciadas mais importante (CDC, 2015).

O agente etiológico mais associado à toxocaríase humana é o nematoide *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães. Entretanto, a importância do nematoide *T. cati*, parasito intestinal de gatos como etiologia da toxocaríase, parece estar subestimada (FISCHER, 2003; RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010). Estes parasitos pertencem ao filo Nematoda, classe Sercenentea, ordem Ascaridida e família Anisakidae. Nos cães jovens, são encontradas as principais taxas de prevalência e as mais altas cargas parasitárias de *T. canis*, devido à elevada prevalência da transmissão vertical na espécie canina (AIRES *et al.*, 2008). Desse modo, os cães são as principais fontes de infecção de *T. canis*, pois estes contaminam o solo do ambiente doméstico e de áreas públicas de recreação, com fezes contendo ovos do parasito (CAPUANO & ROCHA, 2006). Além disso, as altas prevalências de *T. canis* em canídeos domésticos, não tratados regularmente com anti-helmínticos, associado à manutenção do parasito em carnívoros selvagens, tornam difícil o controle deste parasito (MAIZELS, 2013).

A toxocaríase consiste em uma antropozoonose de controle complexo, visto que envolve a participação de hospedeiros definitivos como os cães, raposas e carnívoros selvagens (MAIZELS, 2013) e hospedeiros paratênicos como animais invertebrados, roedores, aves, suínos, bovinos e ovinos (SALEM & SCHANTZ, 1992; TAIRA *et al.*, 2004; MORIMATSU *et al.*, 2006; HOFFMEISTER *et al.*, 2007; CHOI *et*

al., 2008; MAIZELS, 2013). Além disso, o controle também é dificultado pelo fato desta parasitose ser uma geohelmintíase, sendo que os ovos de *Toxocara* spp. são um dos principais contaminantes do solo em muitos países (RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010).

O tratamento das principais formas clínicas da toxocaríase humana se baseia na redução da reação inflamatória desencadeada, e na administração de anti-helmínticos, exceto da forma ocular. Entretanto, os fármacos empregados apresentam eficácia moderada no tratamento desta parasitose (MAGNAVAL *et al.*, 2001; OTHMAN, 2012; WIŚNIEWSKA-LIGIER *et al.*, 2012).

Desse modo, considerando a importância da toxocaríase visceral, torna-se relevante a busca por alternativas que auxiliem no controle desta parasitose. Uma das alternativas é o emprego de probióticos (FAO/WHO, 2001). Estes têm demonstrado resultados promissores para prevenção e tratamento de doenças e na modulação da resposta imune (COPPOLA & GIL-TURNES, 2004; HUMEN *et al.*, 2005; BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005; MARTÍNEZ- GÓMEZ *et al.*, 2006; ROOS *et al.*, 2012, FLESH *et al.*, 2014). Além disso, estudos experimentais têm revelado o potencial de probióticos em promover a redução na carga parasitária por larvas de *T. canis* (BASUALDO *et al.*, 2007; CHIODO *et al.*, 2010; AVILA *et al.*, 2012a).

2 .OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Avaliar em camundongos Balb/c o potencial do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 no controle da toxocaríase visceral.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 sobre a carga parasitária de *Toxocara canis* em camundongos com toxocaríase aguda.

- Investigar *in vitro* o efeito direto do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 sobre larvas de *Toxocara canis*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Toxocaríase humana

O principal modo de infecção para os humanos (hospedeiros acidentais) ocorre pela ingestão de ovos embrionados de *T. canis* presentes em mãos sujas, fômites e hortaliças (MAIZELS *et al.*, 2006; MACPHERSON, 2013). Outras formas de transmissão relatadas são a infecção congênita (MAFFRAND *et al.*, 2006) e o consumo de carne crua ou mal cozida de frangos (MORIMATSU *et al.*, 2006; DUTRA *et al.*, 2014), patos (HOFFMEISTER *et al.*, 2007), ovinos (SALEM & SCHANTZ, 1992), suínos (TAIRA *et al.*, 2004) e bovinos (CHOI *et al.*, 2008; YOSHIKAWA *et al.*, 2008). Estas espécies desempenham o papel de hospedeiros paratênicos, os quais transportam a larva do parasito, na forma infectante de terceiro estágio (L3) (BAER, 1951). Os camundongos também são hospedeiros paratênicos de *T. canis* e são os principais modelos experimentais para o estudo da toxocaríase visceral (MINVIELLE *et al.*, 1997; SCHOENARDIE *et al.* 2013b; AGUIAR *et al.*, 2014; TELMO *et al.*, 2015).

As crianças são mais susceptíveis do que os adultos, pela maior exposição ao solo contaminado por ovos embrionados de *T. canis*, pela geofagia e devido ao seu sistema imunológico imaturo nos primeiros anos de vida (HABLUETZEL *et al.*, 2003, CAPUANO & ROCHA, 2006). No Brasil, alguns estudos sorológicos recentes registram taxas de soroprevalência variadas em crianças: 11 a 15% em São Paulo (SANTARÉM *et al.*, 2011; CASSENOTE *et al.*, 2014); 17 a 51% no Paraná (COLLI *et al.*, 2010; MARCHIORO *et al.*, 2011; MATTIA *et al.*, 2011; MANINI *et al.*, 2012); em torno de 48% na Bahia (MENDONÇA *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.* 2013); e 50,6% no Rio Grande do Sul (SCHOENARDIE *et al.*, 2013a). Apesar destes estudos, que revelam exposição das crianças ao parasito, esta parasitose é subestimada nos serviços de saúde do Brasil (PALUDO *et al.*, 2007).

No organismo humano, as larvas infectantes de *T. canis* migram por órgãos como fígado, pulmões, encéfalo, coração, rins, medula óssea, olhos e músculos estriados, através da via linfática ou hematogênica (DESPOMIER, 2003; PINELLI & ARANZAMENDI, 2012), podendo permanecer alojadas nesses órgãos durante

meses ou anos (BEAVER, 1969). A longa viabilidade de larvas de *T. canis* foi demonstrada em macacos infectados experimentalmente, que após nove anos de infecção apresentavam larvas viáveis para infectar camundongos (BEAVER, 1962). Durante a fase de migração, as larvas do parasito secretam e excretam antígenos, que são constituídos por glicoproteínas antigênicas, responsáveis por desencadear resposta inflamatória (CARVALHO & ROCHA, 2011).

O quadro clínico da toxocaríase humana varia de assintomático a infecções graves. As manifestações clínicas estão relacionadas com a carga parasitária, localização das larvas, idade e resposta imune do hospedeiro. A resposta imune gerada pelo hospedeiro contra larvas de *T. canis* pode ser desencadeada por linfócitos T helper (Th) do tipo Th1 e Th2 e T reg. Na resposta do tipo Th1, ocorre a produção de interleucina 2 (IL-2), IFN γ e ativação de macrófagos importantes na formação de granulomas, que auxiliam na destruição das larvas. Já a resposta do tipo Th2 e T reg estão associadas com a produção de IL-4, IL5, IL-10. A IL-4 promove a diferenciação de células B e anticorpos, produção de IgE, que se liga a superfície das larvas e ativam mastócitos, enquanto que a IL-5, está associada com a diferenciação de eosinófilos responsáveis por secretar grânulos e com o auxílio de mastócitos, são responsáveis pela destruição das larvas e produção de IgE (MAIZELS, 2013). Já a IL-10 (T reg) parece estar associada com a reativação das larvas durante a imunossupressão do hospedeiro (TORINA *et al.*, 2005).

As principais formas clínicas desta parasitose são a LMV clássica, a síndrome da larva *migrans* ocular (LMO) e a toxocaríase oculta (SMITH *et al.*, 2009). A LMV clássica acomete principalmente crianças de até cinco anos de idade e se caracteriza pela leucocitose, acentuada eosinofilia sanguínea e gamaglobulinemia (IgG específica) (MAGNAVAL *et al.*, 2001). Os principais sintomas são febre, mal-estar, perda de peso, asma e problemas respiratórios (SMITH *et al.*, 2009). Por outro lado, a LMO se caracteriza por alterações visuais, com inflamação granulomatosa, estrabismo, deslocamento da retina entre outros, acometendo principalmente crianças a partir de seis anos e adultos (TAYLOR, 2006). A toxocaríase oculta acomete todas as faixas etárias, porém há ausência de eosinofilia sanguínea e a sorologia se mantém moderada (IgG) para *Toxocara* spp. (MAGNAVAL *et al.*, 2001), podendo causar tosse, dor abdominal, cefaleia, distúrbios do sono e alterações de comportamento (SMITH *et al.*, 2009).

O ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando antígenos excretores e secretores de *T. canis* (TES), é o método considerado padrão para o diagnóstico sorológico, visando a detecção de IgG específica (DESPOMIER, 2003; SMITH *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2014). Em áreas de poliparasitismo tem sido empregada a pré-adsorção dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris* sp., visando aumentar a especificidade do ELISA-TES (ELEFANT *et al.*, 2006).

Dentre as limitações do ELISA-TES-IgG, destaca-se a dificuldade da identificação da infecção ativa ou passada, e do diagnóstico em caso de reinfecções (PAWLOWSKI, 2001). Neste sentido, para aumentar a especificidade tem sido empregado o método de *Western blot* ou ELISA-TES-IgG4 (NOORDIN *et al.*, 2005; WATTHANAKULPANICH *et al.*, 2008), utilizando antígenos recombinantes (MOREIRA *et al.*, 2014). Entretanto, a falta de um método padrão ouro, que possa detectar a presença de larvas, impede o estabelecimento da verdadeira sensibilidade e especificidade do teste, e consequentemente, dificulta o diagnóstico definitivo desta parasitose (CDC, 2015). Assim, o diagnóstico da toxocaríase humana se baseia na observação da sintomatologia e em dados laboratoriais e epidemiológicos (SMITH *et al.*, 2009; RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010).

3.2. Dificuldades do controle da toxocaríase humana

A eficácia moderada dos anti-helmínticos empregados no tratamento da LMV clássica e da toxocaríase oculta consiste em uma limitação importante. Os fármacos são os mesmos empregados no tratamento de helmintoses intestinais (albendazol, mebendazol, dietilcarbamazina, ivermectina), porém na toxocaríase humana o alvo do tratamento são as larvas encistadas nos tecidos, e não formas adultas localizadas na parede ou na luz intestinal (LESCANO *et al.*, 2005; RUBINSKI-ELEFANT *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento dos indivíduos infectados assintomáticos ainda é controverso (ANDRADE, 2000), podendo haver reativação das larvas em quiescência por imunossupressão, resultando na migração destas para olhos, podendo ocorrer o surgimento de manifestações oculares tardias (PAWLOWSKI, 2001).

As recomendações básicas para reduzir a transmissão de *T. canis* se baseiam: na posse responsável de cães (CAPUANO & ROCHA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2011); redução da contaminação ambiental pelo tratamento de cães com anti-helmínticos (SOUZA *et al.*, 2011; MACPHERSON, 2013); evitar a ingestão de ovos embrionados de *T. canis* em mãos, fômites e hortaliças (BARRIGA, 1991; MAIZELS

et al., 2006; MACPHERSON, 2013); evitar o consumo de carnes cruas ou mal cozidas de hospedeiros paratênicos (SALEM & SCHANTZ, 1992; TAIRA *et al.*, 2004; MORIMATSU *et al.*, 2006; HOFFMEISTER *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2008; YOSHIKAWA *et al.*, 2008; DUTRA *et al.*, 2014).

Uma dificuldade importante no controle é a resistência dos ovos de *Toxocara* spp. que são constituídos por três membranas, as quais são resistentes a diversos fatores químicos como os desinfetantes e ambientais como temperatura, luminosidade e umidade (QUEIROZ *et al.*, 2009; MAYA *et al.*, 2010). Além disso, a membrana externa destes ovos é composta por mucopolissacarídeos, que são responsáveis pela aderência a superfícies de hortaliças, frutas e poeira (MAYA *et al.*, 2010). Uma alternativa é o controle biológico por fungos nematófagos, os quais são capazes de inviabilizar ovos de nematoides presentes no meio ambiente (GIROTTO *et al.*, 2008). Em estudo recente, o fungo *Paecilomyces lilacinus* reduziu a viabilidade (74,5% - 90,7%) de ovos de *T. canis* e promoveu o rompimento das membranas da casca de ovos embrionados do parasito (MARTINS, 2014).

3.3. Probióticos

Outra alternativa possível é o emprego de microrganismos probióticos que são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Para ser considerado um probiótico, este deve apresentar características como: viabilidade durante o transporte, processamento e armazenamento, capacidade de sobreviver no meio gástrico, capacidade de aderir e colonizar o trato gastrointestinal, capacidade de antagonizar bactérias patogênicas e demonstrar resultados clínicos de saúde (WEST *et al.*, 2009).

Dentre os vários microrganismos usados como probióticos, destacam-se as leveduras e as bactérias ácido-láticas e não ácido-láticas (COPPOLA & GILTURNES, 2004), sendo mais utilizadas as cepas pertencentes às espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ANVISA, 2008).

Na toxocaríase, Basualdo *et al.* (2007) e Chiodo *et al.* (2010), ao testar o probiótico *Enterococcus faecalis* CECT7121, verificaram redução no estabelecimento de larvas em camundongos na fase aguda da infecção. Enquanto que AVILA *et al.* (2012a), ao avaliar o efeito da levedura *Saccharomyces boulardii*, observaram que esta promoveu redução na carga parasitária em camundongos com

toxocaríase visceral aguda (36,7%) e crônica (35,9%). Mesmo quando a dose infectante foi menor (50 ovos), também foi verificado efeito protetor de *S. boulardii* em camundongos (CARDOSO, 2013). Além disso, foi verificada redução da taxa de larvas de *T. canis* (21,6%) transmitidas pela via vertical em camundongos tratados com *S. boulardii* (CRUZ, 2012). Na modulação da resposta imune mediada pelo *S. boulardii* em camundongos foi demonstrado que este probiótico induz aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-17 (AVILA, 2013).

Os mecanismos de ação propostos para explicar o efeito dos probióticos não estão totalmente esclarecidos. No entanto, já existem relatos de que os probióticos apresentam efeitos anti-carcinogênicos (KATO *et al.*, 1988), auxiliam no equilíbrio da microbiota intestinal e na barreira epitelial contra patógenos, na produção de substâncias que reduzem a viabilidade dos patógenos, no bloqueio dos sítios de adesão, na competição por nutrientes, e na modulação da resposta imune (ROLFE, 2000; COPPOLA & GIL-TURNES, 2004).

3.4 *Lactobacillus rhamnosus*

O grupo *Lactobacillus casei* é composto por quatro espécies: *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae* e *L. rhamnosus*. Estas são bactérias Gram-positivas, não esporuladas, anaeróbias facultativas e são associadas à produção de ácido láctico a partir de carboidratos (ALONSO & ISAY, 2007). Estas podem ser encontradas em vários habitats, como na mucosa oral, intestinal e vaginal de humanos e animais (BERNARDEAU *et al.*, 2008). O grupo *L. casei* é um dos grupos mais pesquisados, e este apresenta um importante valor comercial para a indústria farmacêutica e alimentícia, devido ao seu emprego em produtos como iogurtes e leites fermentados, conferindo benefícios pelo uso regular destes produtos (ALONSO & ISAY, 2007).

Em diversos trabalhos científicos é comum a citação de *L. rhamnosus* ATCC 7469 como *L. casei* 7469 (RANDAZZO & COSTAMAGNA, 2005; BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005; BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2008; MARTÍNEZ- GÓMEZ *et al.*, 2011). Em estudos experimentais a cepa *L. rhamnosus* ATCC 7469 tem apresentado resultados satisfatórios sobre seu potencial terapêutico em diferentes infecções parasitárias. Nas protozooses, esta cepa estimula a resposta imune não específica contra *Babesia microti* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005) *Trypanosoma cruzi* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2008), *Plasmodium chabaudi* AS (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2006). Além disso, o *L. rhamnosus* associado às proteínas do

citoesqueleto de *Toxoplasma gondii* é candidato à vacina para toxoplasmose (MARTÍNEZ- GÓMEZ *et al.*, 2009).

Nas helmintoses, *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentou efeito protetor contra a invasão de *Trichinella spiralis* à mucosa intestinal (RANDAZZO & COSTAMAGNA, 2005) e, quando administrado em baixas doses do parasito induziu proteção total contra *T. spiralis* (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2011).

Lactobacillus rhamnosus pode ainda ter várias aplicações clínicas como no tratamento da diarreia aguda infecciosa em crianças, na diarreia associada a antibióticos, na terapia adjuvante de *Helicobacter pylori*, no alívio de sintomas da síndrome do intestino irritado (FLESCH *et al.*, 2014) e na prevenção de doenças bucais (TEANPAISAN *et al.*, 2011).

Considerando que os probióticos do grupo *L. casei* tem sido amplamente estudados e utilizados em produtos para o consumo humano (ALONSO & ISAY, 2007), torna-se importante a realização de estudos que avaliem o efeito do probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469, sobre a infecção causada por *T. canis* em modelos experimentais, visando o controle da toxocaríase visceral.

4. ARTIGO

Probiótico *Lactobacillus rhamnosus* reduz carga parasitária em camundongos na fase inicial da infecção por *Toxocara canis*

Resumo

A toxocaríase visceral é uma zoonose parasitária negligenciada mundialmente, cujo controle é difícil, pela complexidade da biologia do nematoide *Toxocara canis*, principal agente etiológico e o tratamento com fármacos tem eficácia moderada. Estudos experimentais com probióticos têm apresentado resultados promissores para o controle desta parasitose, porém existe a necessidade de ser testado um probiótico que seja facilmente administrado e seguro para o consumo humano. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 sobre a carga parasitária em camundongos BALB/c com toxocaríase aguda. Dois grupos (G) foram formados por 10 camundongos, sendo que os do G1 receberam o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, na concentração de 1.10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), por sonda intragástrica (IG), durante 15 dias pré-inoculação e dois dias pós-inoculação de 100 ovos embrionados de *T. canis*, pela via IG. Os camundongos do G2 (controle) receberam, diariamente, meio de cultivo estéril de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), pela mesma via de administração, durante o mesmo período do G1. A avaliação consistiu na quantificação de larvas recuperadas pela técnica de digestão tecidual de órgãos e musculatura esquelética estriada. Enquanto que o teste *in vitro* do probiótico foi realizado nas concentrações 1.10^6 , 1.10^7 , 1.10^8 , 1.10^9 UFC com 100 larvas por orifício em placa de microcultivo (triplicata). A administração do probiótico reduziu a carga parasitária de larvas de *T. canis* em 53,3% ($p=0,0018$) na fase inicial da infecção em camundongos. No teste *in vitro* o probiótico não apresentou ação direta sobre larvas de *T. canis*, sendo que 89,3% a 93,5% das larvas permaneceram viáveis nas diferentes concentrações avaliadas. Estes resultados mostram o potencial do probiótico *L.rhamnosus* ao promover redução da carga parasitária de larvas de *T. canis* em camundongos, sendo importante estudar os mecanismos de ação promovidos por este probiótico.

Palavras chave: Larva *migrans* visceral; probióticos; intensidade de infecção

Abstract

Visceral toxocariasis is a parasitic zoonosis worldwide neglected, whose control is difficult, by the complexity of nematode biology *Toxocara canis*, main etiologic agent and the treatment with drugs have moderated efficacy. Experimental studies with probiotics have shown promising results to control this parasitosis, but there is necessity to test a probiotic that is easily administered and safe for human consumption. This study aimed to evaluate the effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on the parasite load in BALB/c mice with acute toxocariasis. Two groups (G) were formed by 10 mice, as G1 received probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 at a concentration of 1.10^9 colony forming units (CFU), by intragastric gavage (IG), 15 days pre-inoculation and two days after the inoculation of 100 *T. canis* eggs, via IG. The mice of G2 (control) received daily sterile culture medium de Man, Rogosa and Sharpe (MRS), by the same administration route, and during the same period of G1. The Evaluation consisted in quantifying the larvae recovered by tissue digestion technique of organs and skeletal striated muscle. While the *in vitro* test of probiotic was realized in the concentrations 1.10^6 , 1.10^7 , 1.10^8 , 1.10^9 UFC 100 larvae per hole of the microculture plate (triplicated). The administration of probiotics reduced the parasite load of *T. canis* larvae in 53.3% ($p = 0.0018$) in the early stage of infection in mice. In the *in vitro* test, probiotic showed no direct effect on larvae of *T. canis*, and 89.3% to 93.5% of the larvae remain viable at different concentrations. These results show the potential of probiotic *L. rhamnosus* in promoting the reduction of parasite load of *T. canis* larvae in mice, it is important to study the action mechanism of this probiotic.

Key Words: Visceral larva *migrans*; control; infection intensity

4.1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma zoonose negligenciada mundialmente (CDC, 2015), sendo mais frequente em países em desenvolvimento de clima tropical (SOUZA *et al.*, 2011), e é considerada a helmintose mais prevalente em países industrializados (HOTEZ & WILKINS, 2009). No Brasil, estudos recentes envolvendo crianças mostram elevadas taxas de soroprevalências, de 32,2% a 51,6% (COLLI *et al.*, 2010; MARCHIORO *et al.*, 2011; MATTIA *et al.*, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2012; SCHOENARDIE *et al.*, 2013a; MENDONÇA *et al.*, 2013). No entanto, a prevalência desta parasitose está subestimada devido às dificuldades na realização do diagnóstico (SMITH *et al.*, 2009).

O agente etiológico mais associado a esta parasitose é o nematoide *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães (MEJIA *et al.*, 2014). Os humanos adquirem a toxocaríase, principalmente, pela ingestão de ovos embrionados de *T. canis* (MACPHERSON, 2013). No organismo humano, as larvas de *T. canis* podem se alojar em diversos tecidos como: fígado, pulmões, coração, rins, encéfalo, olhos e musculatura esquelética estriada (DESPOMIER *et al.*, 2003; PINELLI & ARANZAMEDI, 2012), podendo permanecer viáveis durante meses ou até anos (BEAVER, 1969). O tratamento da toxocaríase humana, com exceção da forma ocular, baseia-se na administração dos mesmos anti-helmínticos empregados com êxito no tratamento de helmintoses intestinais. Entretanto, estes fármacos apresentam eficácia moderada (47% a 70%) no tratamento da toxocaríase humana por se tratar de uma parasitose tecidual (MAGNAVAL *et al.*, 2001).

Diante disso, torna-se importante a busca por alternativas que visem auxiliar no controle desta zoonose. Uma dessas alternativas é o emprego de microrganismos probióticos que conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Em relação à toxocaríase visceral, estudos experimentais revelam que a administração do probiótico *Enterococcus faecalis* e *Saccharomyces boulardii* reduziram a carga parasitária por larvas de *T. canis* em camundongos Swiss com toxocaríase aguda (BASUALDO *et al.*, 2007; CHIODO *et al.*, 2010; AVILA *et al.*, 2012a). Além disso, foi sugerida redução da taxa de larvas de *T. canis* (21,6%) transmitidas pela via vertical em fêmeas de camundongos Swiss tratados com *S. boulardii* (CRUZ, 2012), o que se constitui em um resultado relevante, pois na condição de imunossupressão ocorre aumento da intensidade de infecção por larvas de *T. canis* (AVILA *et al.*, 2012b).

Entretanto, é importante a realização da avaliação do efeito de probióticos, já comercializados para o consumo humano, sobre a toxocaríase visceral.

Neste sentido, destacam-se os probióticos do grupo *Lactobacillus casei*, bactérias lácticas, os quais são amplamente empregados na indústria farmacêutica e em produtos industrializados como bebidas lácteas (ANVISA, 2008). Assim, estudos com o probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469, que pertence ao grupo *L. casei*, tem revelado potencial ao reduzir a infecção por *Babesia microti* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005), *Plasmodium chabaudi* AS (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2006), *Trypanosoma cruzi* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2008) e *Trichinella spiralis* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2001; RANDAZZO & COSTAMAGNA, 2005). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a ação do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* sobre a carga parasitária de *Toxocara canis* em camundongos infectados experimentalmente e o efeito *in vitro* do probiótico sobre larvas *T. canis*.

4.2. METODOLOGIA

4.2.1. Obtenção e incubação de ovos de *Toxocara canis*

Cães jovens naturalmente infectados foram tratados com pamoato de pirantel (12,5 mg/kg), por via oral, para obtenção de formas adultas de *T. canis*, e então, foi realizada a colheita de ovos diretamente dos tubos uterinos das fêmeas. A seguir, os ovos foram incubados em solução de formalina 2%, a 28°C, umidade acima de 80% e oxigenação durante 30 dias (AVILA *et al.*, 2012a).

4.2.2. Probiótico *Lactobacillus rhamnosus*

O microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 liofilizado, procedente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, foi ressuspendido em Caldo *Lactobacillus* de Man Rogosa e Sharpe (MRS), durante 15 minutos, a 37°C. Após, o microrganismo foi isolado em meio ágar MRS a 37°C por 48 horas, e então, cultivado em caldo MRS a 37°C por 48 horas, sob agitação constante. A seguir, o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do probiótico foi determinado em meio MRS, por diluições seriadas, para obter a concentração final de 1.10^9 UFC (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2011). Para o controle de qualidade do probiótico foi realizada avaliação da viabilidade da cultura, contagem de colônias e avaliação de pureza através da técnica de gram.

4.2.3. Delineamento experimental do estudo *In vivo*

Dois grupos (G1 e G2) de 10 camundongos BALB/c, fêmeas, de cinco a sete semanas de idade, foram mantidos em ambiente controlado, com temperatura de 22°C (± 1), ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro, oferta de água e ração (sem adição de antibióticos e antifúngicos) *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do Rio Grande (Parecer nº 032/2014).

Nos camundongos do G1 foi administrado o probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 (1.10^9 UFC) (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2011), em caldo MRS, por via intragástrica (IG), durante 15 dias pré-inoculação e dois dias pós-inoculação de 100 ovos embrionados de *T. canis*, pela via IG (AVILA *et al.*, 2012a). Nos camundongos do G2 (controle) foi administrado diariamente caldo MRS estéril (sem probiótico) (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2001), pela via IG, seguindo os mesmos procedimentos descritos no G1. Após 48 horas de infecção, os camundongos foram submetidos a eutanásia pela técnica de deslocamento cervical (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2011).

Após a eutanásia, foi realizada recuperação de larvas pela técnica de digestão tecidual de órgãos (fígado, pulmões, encéfalo, coração, rins, baço e globos oculares) e da musculatura esquelética estriada (carcaça) em solução de pepsina 1% e ácido clorídrico 1%, sob agitação constante, a 37°C, durante 16 horas (XI & JIN, 1998). A seguir, foi realizada a pesquisa e quantificação de larvas de *T. canis*, em microscópio óptico nos aumentos de 100x e 400x.

4.2.4. Avaliação *In vitro* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus*

Para avaliar a possibilidade de ação direta do probiótico sobre o parasito, foi realizado um teste *in vitro*. Nesta etapa, também foi realizada a obtenção e incubação de ovos de *T. canis* (AVILA *et al.*, 2012a). Após, foi realizada a remoção das camadas dos ovos para liberação e colheita das larvas, conforme metodologia descrita por De Savigny (1975). A seguir, as larvas foram incubadas a 37°C, 5% de tensão de CO₂, em meio RPMI-1640 suplementado com HEPES 25mM, glicose a 1%, penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100µg/mL e fungizona 50 µg/mL, de acordo com a metodologia de Maizels *et al.* (1991).

O teste *in vitro* consistiu na incubação de 100 larvas por orifício em placa de microcultivo, em meio RPMI-1640, em diferentes concentrações do probiótico (1.10^6 , 1.10^7 , 1.10^8 , 1.10^9 UFC), a 37°C, tensão de 5% de CO₂, durante 48 horas (em

triplicata). Foram utilizados dois controles de 100 larvas por orifício em meio RPMI-1640: um controle de larvas vivas e outro controle de larvas mortas por congelamento a -20°C, durante 10 dias, seguido por choque térmico a 60°C. Após 48 horas de incubação, foi adicionado o indicador de viabilidade celular azul de Tripán 2%, em todos os orifícios, sendo incubado por mais 30 minutos. A seguir, foi avaliada a motilidade das larvas em microscópio óptico (aumentos 100x e 400x), sendo consideradas vivas as larvas que apresentaram motilidade e ausência da impregnação pelo azul de Tripán (AVILA *et al.*, 2013). O probiótico *L. rhamnosus* também foi testado em meio RPMI 1640, e verificou-se que este meio suplementado não inibiu o probiótico nas diferentes concentrações.

4.2.5. Análise Estatística

Os dados referentes à recuperação de larvas de *T. canis* dos camundongos do G1 e G2 foram comparados pelo test-t de Student, seguindo os critérios estabelecidos pelo teste de homocedasticidade, sendo transformados por Log10, considerando o nível de significância de 0,05 (Bioestat 5.0, 2007). Os dados obtidos com o teste *in vitro* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 0,05 (Bioestat 5.0, 2007).

4. 3. RESULTADOS

Os camundongos para os quais foi administrado o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, durante 15 dias pré-inoculação e dois dias pós-inoculação de ovos de *T. canis*, apresentaram redução de 53,3% no número de larvas recuperadas nos diferentes órgãos. Também foi observada redução significativa na recuperação de larvas do fígado dos camundongos do grupo tratado com probiótico em relação ao grupo controle (**Tabela 1**).

Todos os camundongos dos dois grupos apresentaram positividade para larvas de *T. canis* no fígado, confirmando a infecção aguda com dois dias pós-inoculação. Apenas um camundongo do grupo controle apresentou-se positivo para três larvas nos pulmões. Nos demais órgãos e na musculatura esquelética estriada não foram recuperadas larvas de *T. canis*.

Tabela 1 - Redução média do número de larvas de *Toxocara canis* em camundongos com toxocaríase aguda (48 horas de infecção), tratados com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (n=10).

Grupos		Recuperação média total	Recuperação média no fígado	
G1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4,9 ($\pm 2,1$)	4,9 ($\pm 2,1$)	
G2	Controle	10,5 ($\pm 5,1$)	10,2 ($\pm 4,7$)	
Redução		53,3%	p= 0,0018	51,9% ' p= 0,0018

No teste *in vitro*, não houve ação direta do probiótico sobre larvas de *T. canis* ($p > 0,05$) nas diferentes concentrações do probiótico. Na **Tabela 2**, podem ser observados os percentuais de larvas com motilidade positiva e ausência da impregnação pelo azul de tripan. No controle de larvas mortas, 100% apresentaram-se sem motilidade e foram impregnadas pelo azul de Tripan.

Tabela 2 - Percentual médio de larvas de *Toxocara canis* viáveis submetidas as diferentes concentrações de *Lactobacillus rhamnosus*. Parâmetros avaliados: motilidade das larvas e impregnação pelo indicador de viabilidade azul de Tripan.

Larvas (n=100)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (UFC)				Controle de larvas vivas*
	1. 10 ⁶	1. 10 ⁷	1. 10 ⁸	1. 10 ⁹	
Larvas viáveis (%)	93,5	89,3	90,9	91,1	96,2

* Sem probiótico

4.4. DISCUSSÃO

A redução de 53,3% ($p = 0,0018$) na carga parasitária por larvas de *T. canis* em camundongos administrados com o probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 constitui-se no primeiro registro do potencial deste probiótico para auxiliar no controle da toxocaríase visceral. Este resultado é relevante, visto que o probiótico *L. rhamnosus* é

considerado seguro para o uso humano (ANVISA, 2008). Também é importante ressaltar que o potencial do probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 demonstrado no controle da toxocaríase visceral murina, já tinha sido registrado sobre o helminto *Trichinella spiralis*, agente etiológico de outra parasitose tecidual, a triquinelose (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2001; RANDAZZO & COSTAMAGNA, 2005). Além disso, estudos experimentais têm revelado o potencial deste probiótico no controle de parasitoses sistêmicas causadas por *Babesia microti* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005), *Trypanosoma cruzi* (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2008), e *Plasmodium chabaudi* AS (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2006).

A redução da carga parasitária de larvas de *T. canis* obtida com *L. rhamnosus* ATCC 7469 (53,3%) foi superior em relação aos resultados no estudo com *S. boulardii* (36,7%) (AVILA *et al.*, 2012a) e inferior (89,9%) aos observados no estudo com *Enterococcus faecalis* CECT7121 (BASUALDO *et al.*, 2007) em camundongos com toxocaríase aguda. Esta diferença pode ser explicada pela via de administração dos probióticos, sendo que *S. boulardii* foi administrado na ração, enquanto que os outros dois probióticos foram administrados pela via intragástrica, permitindo o controle da dose individual diária e a obtenção de resultados mais fidedignos. Além disso, o sobrenadante do cultivo do *L. rhamnosus* pode ter contribuído com algum efeito benéfico para o resultado encontrado, pois este foi inoculado junto com o probiótico nos camundongos do grupo tratado (G1). Outro fator importante, é que cada probiótico apresenta mecanismos de ação diferentes, podendo atuar de maneiras distintas sobre o sistema imune do hospedeiro, o que poderia explicar os diferentes resultados encontrados nos três estudos. Entretanto, no estudo com *Enterococcus faecalis*, o desvio padrão da recuperação de larvas do grupo controle foi alto (20), com média de 27,7 larvas recuperadas, dificultando a comparação dos resultados.

Em relação à distribuição das larvas de *T. canis*, 100% destas foram recuperadas no fígado dos camundongos do grupo que recebeu probiótico (G1) e 97,1% foram recuperadas no fígado dos camundongos do grupo controle (G2). Esta distribuição é característica da fase inicial da toxocaríase, pois foram examinados camundongos após dois dias da inoculação de ovos embrionados do parasito, fase da infecção que, geralmente, ocorre um acúmulo de larvas no fígado (TAIRA *et al.* 2003; BASUALDO *et al.*, 2007; AVILA *et al.*, 2012a).

O probiótico *L. rhamnosus* não apresentou ação direta sobre as larvas de *T. canis* no teste *in vitro*, visto que 89,3% a 93,5% das larvas permaneceram viáveis nas diferentes concentrações avaliadas. Estes resultados foram semelhantes ao do controle de larvas vivas, que apresentou 96,2% das larvas viáveis ($p>0,05$). O período de 48 horas para incubação *in vitro* de larvas, foi o mesmo em que foi observada a redução do número de larvas de *T. canis* recuperadas nos camundongos do grupo tratado com o probiótico *L. rhamnosus* (G1), em relação ao controle (G2).

Estes resultados são semelhantes aos obtidos no teste *in vitro* que avaliou a ação do probiótico *S. boulardii* sobre larvas de *T. canis*, sendo que a maioria das larvas (97,6%) estava viável (AVILA *et al.* 2013). Assim, como ocorre com o *S. boulardii* existe a necessidade do contato do probiótico *L. rhamnosus*, com a mucosa intestinal do hospedeiro, para que ocorra ação sobre larvas de *T. canis*. Entretanto, estes resultados são discordantes quando comparado aos do teste *in vitro* com *E. faecalis* CECT7121, visto que este probiótico apresenta ação direta sobre as larvas, causando a morte destas larvas após 48 horas de incubação (CHIODO *et al.*, 2010). Neste sentido, torna-se importante investigar mecanismos de modulação da resposta imune mediada por *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Dentre os mecanismos de ação envolvidos pelo *L. rhamnosus*, pode-se citar: a capacidade de aderência e colonização na mucosa intestinal (TUOMOLA & SALMINEN, 1998); indução da resposta imune não-específica (RANDAZZO & COSTAMAGNA, 2005; BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005; MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2006; 2009); estímulo da atividade fagocítica de macrófagos (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2005) e indução da produção de citocinas como IFN γ (BAUTISTA-GARFIAS *et al.*, 2001); IL-4 (MARTÍNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2011), e IL-12 (SHIDA *et al.*, 2006).

Os resultados encontrados mostram o potencial do probiótico *L. rhamnosus* em promover a redução da carga parasitária por larvas de *T. canis*, sendo importante estudar os mecanismos de modulação da resposta imune, já que foi descartada a ação direta do probiótico sobre larvas de *T. canis*. Assim, torna-se importante ampliar os estudos sobre *L. rhamnosus*, visto que este é amplamente utilizado na indústria farmacêutica e em bebidas lácteas, deste modo, podendo ser empregado como uma alternativa no controle da toxocaríase visceral.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 14 de fev. 2015.
- AVILA, L. F. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; TELMO, P. L.; DUTRA, G. F.; SANTOS, D. G.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. **Vet Parasitol**, v.187, p. 337-340, 2012a.
- AVILA, L. F. C.; FONSECA, J. S. V.; DUTRA, G. F.; TELMO, P. L.; AZAMBUJA, A. M.; 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, 2012b.
- AVILA, L. F. C.; TELMO, P. L.; MARTINS, L. H. R.; GLAESER, T. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; SCAINI, C. J. Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.55, n.5, p.363-365, 2013.
- BASUALDO, J.; SPARO, M.; CHIODO, P.; CIARMELA, M.; MINVIELLE, M. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. **Ann Trop Med Parasitol**, v.101, n.6, p.559-562, 2007.
- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; GOMEZ, M. B.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTINEZ-GÓMEZ, F.; MOSQUEDA, J. The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. **Parasitol Res**, v.97, p.472-477, 2005.
- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; ALVAREZ, M. C. T.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F. M. The inoculation of *Lactobacillus casei* in NIH mice induces a protective response against *Trypanosoma cruzi* (Ninoa strain) infection. **Vet Mex**, v.39, n.2, p.139-144, 2008.
- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; LÓPEZ, M. G.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. **Parasite**, v.8, p.226-228, 2001.
- BEAVER, P. C. The nature of visceral larva *migrans*. **J Parasitol**, v.55, n.1, p.3-12, 1969.
- CDC Division of Parasitic Diseases, National Center for infectious Diseases Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/>. Acesso em 27/02/2015.
- CHIODO, P. G.; SPARO, M. D.; PEZZANI, B. C.; MINVIELLE, M. C.; BASUALDO, J. A. *In vitro* and *in vivo* effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.5, p.615-620, 2010.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probiotics and immune response. **Cienc Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

COLLI, M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; PALUDO, M. L.; FALAVIGNA, D. L. M.; GUILHERME, E. V.; MATTIA, S.; ARAÚJO, S. M.; FERREIRA, E. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of South Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 69-74, 2010.

CRUZ, L. A. X. **Efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre a transmissão vertical em camundongos com toxocaríase**. 2012. 55pf. Dissertação de mestrado em Parasitologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal de Pelotas .

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.781-782, 1975.

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

FAO/WHO. **World Health Organization**. Joint FAO/WHO Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

HOTEZ, P. J; WILKINS, P. P. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance?. **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, n.3, p.1-4, 2009.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. **Cancer Immunol Immunother**, v.26, n.3, p.215-221, 1988.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **Int J Parasitol**, v.43, p.999 -1008, 2013.

MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **Korean J Parasitol**, v.39, n.1, 2001.

MAIZELS, R. M.; BLAXTER, M. L.; ROBERTSON, B. D.; SELKIRK, M. E. Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. **Cambridge University Press**, p.224, 1991.

MARCHIORO, A. A.; COLLI, C. M.; MATTIA, S.; PALUDO, M. L.; MELO, G. C.; ADAMI C. M.; PELLOSO, S. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Avaliação eosinofílica e soropositividade para anticorpos IgG anti-*Toxocara* em crianças atendidas pelo Sistema Único de Saúde. **Rev Paul Pediatr**, v.29, n.1, p.80-84, 2011.

MARTINEZ-GÓMEZ, F.; CASTRO, B. E. F.; GARFIAS C. R. B. The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses. **Parasitol Res**, v.109, p.1609-1617, 2011.

- MARTINEZ-GÓMEZ, F.; GARCÍA-GONZÁLEZ, L. F.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; BAUTISTA-GARFIAS, C. R. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. **Vet Parasitol**, v.160, p.311-315, 2009.
- MARTINEZ-GÓMEZ, F.; RODRÍGUEZ, O. I.; FIGUEROA, B. A.; CRUZ, R. H.; OSTRIA, A. M. *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* enhances non specific protection against *Plasmodium chabaudi* AS in mice. **Salud Publica Mex**, v.48, p. 498-503, 2006.
- MATTIA, S.; COLLI, C. M.; ADAMI, C. M.; GUILHERME, G. F.; NISHI, L.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; MARCHIORO, A. A.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **J Helminthol**, v. 86, n.4, p.440-445, 2011.
- MEJIA, A. B.; OLAVE, C. A.; BETANCOURT, L. S. C.; MONDOLFI, A. P.; DELGADO, O.; MORALES, A. J. R. Toxocariasis in the Americas: Burden and disease control. **Curr Trop Med Rep**, v.1, p.62-68, 2014.
- MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONE, R. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPER, P.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Trop**, v.128, n.1, p.90-95, 2013.
- MENDONÇA, L. R.; VEIGA, R. V.; DATTOLI, V. C.; FIGUEIREDO, C. A.; FIACCONE, R. L.; SANTOS, J.; CRUZ, Á. A.; RODRIGUES, L. C.; COOPER, P.J.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-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, 2012.
- PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v.12, n.1, p.33-44, 2012.
- RANDAZZO, V.; COSTAMAGNA, S. R. Effect of oral administration of probiotic agents on *Trichinella spiralis* - Infected mice. **Rev Patol Trop**, v.34, n.2, p.129-135, 2005.
- ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J Nutr**, v.130, p.396-402, 2000.
- 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. **J Parasitol**, v.99, n.3, p.537-539, 2013a.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **Am J Clin Nutr**, v.73, n.2, p.361-364, 2001.
- SHIDA, K.; KIYOSHIMA-SHIBATA, J.; NAGAOKA, M.; WATANABE, K.; NANNO, K. M. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. **J Dairy Sci**, v.89, p.3306-3317, 2006.

SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J. F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasitol**, v.25, n.4, 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. **Rev Soc Bra Med Trop**, v.44, n.4, p.516 – 519, 2011.

TAIRA, K.; PERMIN, A.; KAPEL, C. M. O. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. **Parasitol Res**, v.90, p.521–523, 2003.

TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **Int J Food Microbiol**, v.41, p.45-51, 1998.

XI, W. G.; JIN, L. Z. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **J Helminthol**, v.72, p.183-184, 1998.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A administração do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 reduziu significativamente a carga parasitária de *Toxocara canis* em camundongos com toxocaríase aguda.
- O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 não apresentou ação direta sobre larvas de *Toxocara canis* no teste *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 14 de fev. 2015.
- AGUIAR, P. S.; FURTADO, R. D.; AVILA, L. F. C.; TELMO, P. L.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. Transmammary infection in BALB/c mice with chronic toxocariasis. **Parasitol Int**, v.14, p.58-60, 2014.
- AIRES, W. O.; FRIAS, R. B.; PASCHOAL, G. R.; NEVES, M. F. Toxocaríase e larva *migrans* visceral. **Rev.Cient. Elet. Med.Vet**, v.11, 2008.
- ALONSO, F. C. B.; ISAY, S. M. S. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. **Arch Latinoam Nutr**, v.57, n.4, p.373-380, 2007.
- ANDRADE, L. D. Aspectos clínico-epidemiológicos da toxocaríase humana. **Rev Patol Trop**, v.29, n.2, p.147-159, 2000.
- AVILA, L. F. C. **Efeito imunomodulador de *Saccharomyces boulardii* em camundongos experimentalmente infectados por *Toxocara canis***. 2013. 72pf. Tese de Doutorado em Parasitologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal de Pelotas.
- AVILA, L. F. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; TELMO, P. L.; DUTRA, G. F.; SANTOS, D. G.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. **Vet Parasitol**, v.187, p. 337-340, 2012a.
- AVILA, L. F. C.; FONSECA, J. S. V.; DUTRA, G. F.; TELMO, P. L.; AZAMBUJA, A. M.; 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, 2012b.
- AVILA, L. F. C.; TELMO, P. L.; MARTINS, L. H. R.; GLAESER, T. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; SCAINI, C. J. Protective effect of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the larvae. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.55, n.5, p.363-365, 2013.
- BAER, J. G. Ecology of animal parasites. **University of Illionois Press, Urbana Ill**, p. 11-12, 1951.

BARRIGA, O. O. Rational control of canine toxocariasis by the veterinary practioner. **J Am Vet Med Assoc**, v.98, p.216-221, 1991.

BASUALDO, J.; SPARO, M.; CHIODO, P.; CIARMELA, M.; MINVIELLE, M. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. **Ann Trop Med Parasitol**, v.101, n.6, p.559-562, 2007.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; ALVAREZ, M. C. T.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F. M. The inoculation of *Lactobacillus casei* in NIH mice induces a protective response against *Trypanosoma cruzi* (Ninoa strain) infection. **Vet Mex**, v.39, n.2, p.139-144, 2008.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; GOMEZ, M. B.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTINEZ-GÓMEZ, F.; MOSQUEDA, J. The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. **Parasitol Res**, v.97, p.472-477, 2005.

BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; LÓPEZ, M. G.; AGUILAR-FIGUEROA, B. R. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. **Parasite**, v.8, p.226-228, 2001.

BEAVER, P. C. The nature of visceral Larva *migrans*. **J Parasitol**, v.55, n.1, p.3-12, 1969.

BEAVER, P. C. Toxocarosis (visceral larva *migrans*) in relation to tropical eosinophilia. **Bull Soc Pathol Exot Filiales**, v.55, p.555–576, 1962.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **Int J Food Microbiol**, v.126, p.278-285, 2008.

CAPUANO, D. M.; ROCHA, G. M. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol**, v.9, n.1, 2006.

CARDOSO, P. D. **Avaliação do probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre a intensidade de infecção em hospedeiros paratênicos de *Toxocara canis***. 2013. 54pf.Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande.

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

CASSENTE, A. J. F.; LIMA, A. A.; NETO, J. M. P.; RUBINSKY-ELEFANT, G. Seroprevalence and Modifiable Risk Factors for *Toxocara* spp. in Brazilian Schoolchildren. **PLoS Negl Trop Dis**, v.8, n.5, 2014.

CDC Division of Parasitic Diseases, National Center for infectious Diseases Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis/>. Acesso em 27/02/2015.

CHIODO, P. G.; SPARO, M. D.; PEZZANI, B. C.; MINVIELLE, M. C.; BASUALDO, J. A. *In vitro* and *in vivo* effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.5, p.615-620, 2010.

CHOI, D.; LIM, J. H.; CHOI, D. C.; PAIK, S. W.; KIM, S. K.; HUH, S. Toxocariasis and ingestion of raw cow Liver in patients with eosinophilia. **Korean J Parasitol**, v.46, n.3, p.139-143, 2008.

COLLI, M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; PALUDO, M. L.; FALAVIGNA, D. L. M.; GUILHERME, E. V.; MATTIA, S.; ARAÚJO, S. M.; FERREIRA, E. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of South Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.52, n.2, p.69-74, 2010.

COPPOLA, M. M.; GIL-TURNES, C. Probiotics and immune response. **Cienc Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

CRUZ, L. A. X. **Efeito do probiótico *Saccharomyces boulardii* sobre a transmissão vertical em camundongos com toxocaríase**. 2012. 55pf. Dissertação de mestrado em Parasitologia, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Universidade Federal de Pelotas.

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.781-782, 1975.

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

DUTRA, G. F.; PINTO, N. S. F.; AVILA, L. F. C.; DUTRA, P. C.; TELMO, P. L.; SILVA, L. H.; AZAMBUJA, A. M. W.; SCAINI, C. J. Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. **Vet Parasitol**, v.203, p.87-90, 2014.

ELEFANT, G. R.; SHIMIZU, S. H.; SANCHEZ, M. C. A.; JACOB, M. A.; FERREIRA, A. W. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Lab Anal**, v.20, n.4, p.164 -172, 2006.

FAO/WHO. **World Health Organization**. Joint FAO/WHO Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

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

FLESC, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D.C. O uso terapêutico dos simbióticos. **Arq Bras Cir Dig**, v.27, n.3, p.206-209, 2014.

GIROTO, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas: Revisão de literatura. **Rev Cient Elet Med Vet**, v.10, 2008.

HABLUETZEL, A.; TRALDI, G.; RUGGIERI, S.; ATTILI, A. R.; SCUPPA, P.; MARCHETTI, R.; MENGHINI, G.; ESPOSITO, F. An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Vet Parasitol**, v.113, p.243-252, 2003.

HOFFMEISTER, B.; GLAESER, S.; FLICK, H.; PORNSCHLEGEL, S.; SUTTORP, N.; BERGMANN, F. Cerebral toxocariasis after consmption of raw duck liver. **Am J Trop Med Hyg**, v.76, n.3, p.600-602, 2007.

HOTEZ, P. J.; WILKINS, P. P. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance?. **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, n.3, p.1-4, 2009.

HUMEN, M. A.; DE ANTONI, G. L.; BENYACOU, J.; COSTAS, M. E.; CARDOZO, M. I.; KOZUBSKY, L.; SAUDAN, K. Y. BOENZLI-BRUAND, A.; BLUM, S.; SCHIFFRIN, E. J.; PÉREZ, P. F. *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. **Infect immun**, v.73, n.2, p.1265-1269, 2005.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. **Cancer Immunol Immunother**, v.26, n.3, p.215-221, 1988.

LESCANO, S. Z.; CHIEFFI, P. P.; NETO, V. A.; IKAI, D. K.; RIBEIRO, M. C. S. A. Anti-helmínticos na toxocaríase experimental: Efeito na recuperação de larvas de *Toxocara canis* e na resposta humoral. **J Bras Patol Med Lab**, v.41, n.1, p.21-24, 2005.

MACPHERSON, C. N. L. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **Int J Parasitol**, v.43, p.999-1008, 2013.

MAFFRAND, R.; AVILA-VAZQUEZ, M.; PRINCICH, D.; ALASIA, P. Congenital ocular toxocariasis in a premature neonate. **An Pediatr (Barc)**, v.64, n.6, p.599-600, 2006.

MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **Korean J Parasitol**, v.39, n.1, 2001.

MAYA, C.; ORTIZ, M.; JIMÉNEZ, B. Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. **Water Sci Technol**, v.62, n.11, p.2616-2624, 2010.

MAIZELS, R. M. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. **Vet Parasitol**, v.193, n.4, p.365-374, 2013.

MAIZELS, R. M.; BLAXTER, M. L.; ROBERTSON, B. D.; SELKIRK, M. E. Parasite antigens, parasite genes. A laboratory manual for molecular parasitology. **Cambridge University Press**, p.224, 1991.

MAIZELS, R. M.; SCHABUSSOVA, D. M.; CALLISTER, G.; NICOL, L. Molecular biology and immunology of *Toxocara canis*. in: HOLLAND, C H, SMITH, H. **Toxocara The Enigmatic Parasite, UK**: CabiPublishing, v.1, p.13-17, 2006.

MANINI, M. P.; MARCHIORO, A. A.; COLLI, C. M.; NISHI, L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. **Vet Parasitol**, v. 118, n.1, 48–52, 2012.

MARCHIORO, A. A.; COLLI, C. M.; MATTIA, S.; PALUDO, M. L.; MELO, G. C.; ADAMI C. M.; PELLOSO, S. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Avaliação eosinofílica e soropositividade para anticorpos IgG anti-*Toxocara* em crianças atendidas pelo Sistema Único de Saúde. **Rev Paul Pediatr**, v.29, n.1, p.80-84, 2011.

MARTINEZ-GÓMEZ, F.; CASTRO, B. E. F.; GARFIAS C. R. B. The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses. **Parasitol Res**, v.109, p.1609-1617, 2011.

MARTINEZ-GÓMEZ, F.; GARCÍA-GONZÁLEZ, L. F.; MONDRAGÓN-FLORES, R.; BAUTISTA-GARFIAS, C. R. Protection against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation in mice immunized with *Toxoplasma gondii* cytoskeleton proteins and *Lactobacillus casei* as adjuvant. **Vet Parasitol**, v.160, p.311-315, 2009.

MARTINEZ-GÓMEZ, F.; RODRÍGUEZ, O. I.; FIGUEROA, B. A.; CRUZ, R. H.; OSTRIA, A. M. *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* enhances non specific protection against *Plasmodium chabaudi* AS in mice. **Salud Publica Mex**, v.48, p.498-503, 2006.

MARTINS, N. O. **Avaliação do efeito de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Toxocara canis* utilizando indicadores de viabilidade**. 2014. 54f. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014. MATTIA, S.; COLLI, C. M.; ADAMI, C. M.; GUILHERME, G. F.; NISHI, L.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; MARCHIORO, A. A.; GOMES, M. L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **J Helminthol**, v. 86, n.4, p.440-445, 2011.

MEJIA, A. B.; OLAVE, C. A.; BETANCOURT, L. S. C.; MONDOLFI, A. P.; DELGADO, O.; MORALES, A. J. R. Toxocariasis in the Americas: Burden and disease control. **Curr Trop Med Rep**, v.1, p.62-68, 2014.

MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONE, R. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPER, P.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Trop**, v.128, n.1, p.90-95, 2013.

MENDONÇA, L. R.; VEIGA, R. V.; DATTOLI, V. C.; FIGUEIREDO, C. A.; FIACCONE, R. L.; SANTOS, J.; CRUZ, Á. A.; RODRIGUES, L. C.; COOPER, P.J.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-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, 2012.

MINVIELLE, M. C.; PEZZANI, B. C.; BASUALDO, J. A.; NIEDFELD, G. Fasting influence in experimental toxocarosis. **Neotropica**, v.43, p.47-51, 1997.

MOREIRA, G. M.; TELMO, P. L.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, A. N.; MCBRIDE, A. J. A.; SCAINI, C. J.; CONCEIÇÃO, F. R. Human toxocariasis: current advances in

diagnostics, treatment, and interventions. **Trends Parasitol**, v.30, n.9, p.456-464, 2014.

MORIMATSU, Y.; AKAO, N.; AKIYOSHI, H.; KAWAZU, T.; OKABE, Y.; AIZAWA, H. A familial case of visceral larva *migrans* after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.2, p.303-306, 2006.

NOORDIN, R.; SMITH, H. V.; MOHAMAD, A.; MAIZELS, R. M.; FONG, M. Y. Comparision of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. **Acta Trop**, v.93, n.1, p.57-62, 2005.

OTHMAN, A. A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: are we still far behind?. **Acta Trop**, v.124, n.3, p.171–178, 2012.

PALUDO, M. L.; FALAVIGNA, D. L. M.; ELEFANT, G. R.; GOMES, M. L.; BAGGIO, M. L. M.; AMADEI, L. B.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.49, n.6, p.343-348, 2007.

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

PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. *Toxocara* infection and its association with allergic manifestations. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v.12, n.1, p.33-44, 2012.

QUEIROZ, M. L.; MEHLMANN, F. M. G.; PASCHOALOTII, M. A.; LESCANO, S. A. Z.; CHIEFII, P. P. Efeito de variáveis ambientais na evolução de ovos de *Toxocara canis* em condições experimentais. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**, v.54, n.1, p.6-8, 2009.

RANDAZZO, V.; COSTAMAGNA, S. R. Effect of oral administration of probiotic agents on *Trichinella spiralis* - Infected mice. **Rev Patol Trop**, v.34, n.2, p.129-135, 2005.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **J Nutr**, v.130, p.396-402, 2000.

ROOS, T. B.; de LARA, A. P.; DUMMER, L. A.; FISCHER, G.; LEIVAS LEITE, F. P. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated Bovine Herpesvirus Type 5 vaccine. **Vaccine**, v.30, p.2173-2177, 2012.

RUBINSKI-ELEFANT, G.; HIRATA, C. E.; YAMAMOTO, H. J.; FERREIRA, U. M. 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.

SALEM, G.; SCHANTZ, P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. **Clin Infect Dis**, v.15, n.4, p.743–744, 1992.

SANTARÉM, V. A.; LELI, F. N. C.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; GIUFFRIDA, R.: Protective and risk factors for toxocariasis in children from two different social classes of Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, n.53, p.66-72, 2011.

- SCHOENARDIE, E. R.; SCAINI, C. J.; PEPE, M. S.; BORSUK, S.; AVILA, L. F.; VILLELA, M.; BERNE, M. E. Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. **Rev Bras Parasitol Vet**, v.22, n.4, p.623–626, 2013b.
- 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. **J Parasitol**, v.99, n.3, p.537-539, 2013a.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **Am J Clin Nutr**, v.73, n.2, p.361-364, 2001.
- SHIDA, K.; KIYOSHIMA-SHIBATA, J.; NAGAOKA, M.; WATANABE, K.; NANNO, K. M. Induction of interleukin-12 by *Lactobacillus* strains having a rigid cell wall resistant to intracellular digestion. **J Dairy Sci**, v.89, p.3306-3317, 2006.
- SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J. F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends Parasitol**, v.25, n.4, 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. **Rev Soc Bra Med Trop**, v.44, n.4, p.516 – 519, 2011.
- TAIRA, K.; PERMIN, A.; KAPEL, C. M. O. Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. **Parasitol Res**, v.90, p.521–523, 2003.
- TAIRA, K.; SAEED, I.; PERMIN, A.; KAPEL, C. M. O. Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. **Vet Parasitol**, v.21, p.115-124, 2004.
- TAYLOR, M.R.H. Ocular Toxocariasis in: **Toxocara: the Enigmatic Parasite**, 2006.
- TEANPAISAN, R.; PIWAT, S.; DAHLÉN, G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. **Lett Appl Microbiol**, v.53, n.4, p.452-459, 2011.
- TELMO, P. L.; AVILA, L. F. C.; SANTOS, C. A.; AGUIAR, P. S.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, E.; SCAINI, C. J. Elevated trans-mammary transmission of *Toxocara canis* larvae in BALB/c mice. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.57, n.1 p.85, 2015.
- 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 production in pregnant dogs and their puppies. **Vet immunol immunopathol**, v.108, n.1, p.247-251, 2005.
- TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **Int J Food Microbiol**, v.41, p.45-51, 1998.
- WATTHANAKULPANICH, D.; SMITH, H. V.; HOBBS, G.; WHALLEY, A. J.; BILLINGTON, D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. **Acta Trop**, v.106, n.2, p.90–95, 2008.

WEST, N. P.; PYNE, D. B.; PEAKE, J. M.; CRIPPS, A. W. Probiotics, immunity and exercise: a review. **Exerc Immunol Rev**, v.15, p.107-126, 2009.

WIŚNIEWSKA-LIEGER, M.; WÓZNIAKOWSKA-GESICKA, T.; SOBOLESKA-DRYJAŃSKA, J.; MARKIEWICZ-JOŹWIAK, A.; WIECZOREK, M. Analysis of the course and treatment of toxocariasis in children-a long term observation. **Parasitol Res**, v.110, n.6, p.2363-2371, 2012

YOSHIKAWA, M.; NISHIOFUKU, M.; MORIYA, K.; OUJI, Y.; ISHIZAKA, S.; KASAHARA, K.; MIKASA, K.; HIRAI, T.; MIZUNO, Y.; OGAWA, S.; NAKAMURA, T.; MARUYAMA, H.; AKAO, N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. **Parasitol Int.**, v.57, n.4, p.525–529, 2008.

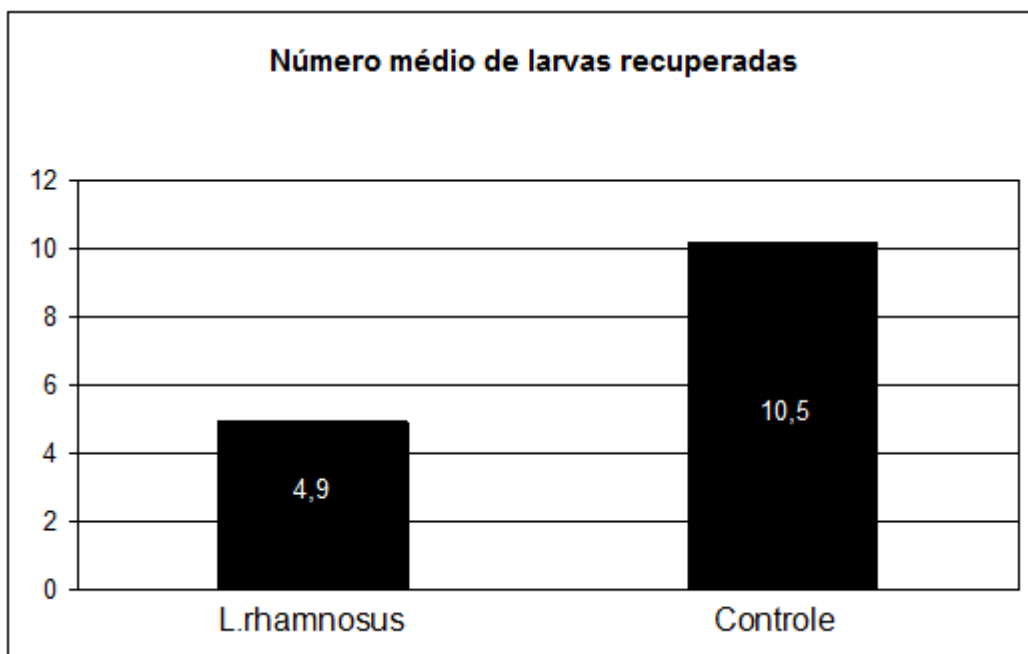
XI, W. G.; JIN, L. Z. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **J Helminthol**, v.72, p.183-184, 1998.

Apêndices

Apêndice A - Distribuição de larvas de *Toxocara canis* recuperadas nos camundongos do grupo controle (G2) durante 15 dias antes e 2 dias pós-inoculação com 100 ovos embrionados (n=10).

Animal	Fígado	Rins	Encéfalo	Carcaça	Pulmões	Coração	Baço	Globo Ocular
1	20	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
2	15	Zero	Zero	Zero	3	Zero	Zero	Zero
3	13	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
4	11	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
5	11	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
6	7	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
7	6	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
8	6	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
9	7	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
10	6	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero
Total	102	Zero	Zero	Zero	3	Zero	Zero	Zero

Apêndice B - Número médio de larvas de *Toxocara canis* recuperadas dos camundongos do grupo tratado com *Lactobacillus rhamnosus* (G1) e controle (G2) 2 dias pós-inoculação com 100 ovos embrionados (n=20).



Apêndice B - Número médio de larvas de *Toxocara. canis* recuperadas do fígado dos camundongos do grupo tratado com *Lactobacillus rhamnosus* (G1) e controle (G2) 2 dias pós-inoculação com 100 ovos embrionados (n=20).

