

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OVOS DE *Toxocara canis*
APÓS A AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS

EMY HIURA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OVOS DE *Toxocara canis*
APÓS A AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

EMY HIURA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

H676a

Hiura, Emy.

Avaliação da infectividade de ovos de toxocara canis após a ação de fungos nematófagos / Emy Hiura. – 2015.
49 f.: il.

Orientador: Fabio Ribeiro Braga

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Helminto. 2. Cão. 3. Cão – Doenças. I. Braga, Fabio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.7

EMY HIURA

**AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OVOS DE *Toxocara canis*
APÓS A AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS**

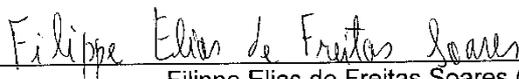
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como
pré-requisito do Programa de
Pós-graduação em Ciência
Animal, para a obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2015

Banca Examinadora:



Leandro Abreu da Fonseca (UFV)



Filipe Elias de Freitas Soares (UVV)



Fábio Ribeiro Braga (UVV)
(orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, a minha família e ao meu namorado, pelo amor, paciência e apoio incondicional.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, Eiji Hiura e Mitsuko Inoue pelo incentivo, pelo apoio e por todos os esforços que fizeram até hoje.

Á minha prima Cristina Keiko Teruia pela amizade de longa data, pelos momentos de descontração e pela ajuda.

Agradeço ao meu namorado Victor Trellesse Weber, pelo amor, por sempre me encorajar a alcançar meus objetivos, por me ajudar, por compreender e apoiar as minhas decisões.

A todos da minha família pela companhia, conversas, conselho e alegria.

As minhas amigas Aline Garcia, Jeanne Saraiva e Maylla Gava pela ajuda, apoio e paciência, sem a colaboração delas esse trabalho não se realizaria. E também pelos momentos engraçados e risadas.

Aos meus amigos Leandro e Fabricia, pelos conselhos, amparo, risada e os momentos de diversão.

Aos meus queridos IC's, Maranhão, Manu, Gabi, Bruno F., Caio, Fred, Rafa, Jojo, Bruno A., Julia, pelos sábados perdidos, pelas conversas, pela ajuda e pela amizade.

Aos meus estagiários do laboratório clínico pelas conversas e diversão.

Agradeço a todos os meus amigos de longa data e aos recentes, pela sua amizade, felicidade e apoio, em especial para Sayuri, Miriam, Letícia, Gorette, Thiago, Alice, Yhuri, Isabela, Anderson e Daniel.

Aos funcionários da UVV, Fabão, Irene e Adriano, pelo auxílio e pelas brincadeiras.

Aos professores Andréa Alves, Marcelo Renan, Luciana Felício de Paula, Tayse Domingues e Mayra Cunha Flecher, pelas palavras de incentivos, ajuda e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao meu orientador Fábio Ribeiro Braga pela oportunidade, paciência e pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

Agradeço a Universidade de Vila Velha e Universidade Federal de Viçosa que proporcionou suporte e material para a execução do projeto de pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A - Larva de *T. canis* com presença de clamidósporos do fungo *D. flagrans* na superfície (seta preta). B e C - Larva de *T. canis* com presença de clamidósporos e hifas do fungo *D. flagrans*, com alteração morfológica da larva (seta preta). D - Larva de *T. canis* destruída com presença interna de hifas do fungo *D. flagrans* (seta preta). Microscopia de luz - objetiva de 10x.

Figura 2: A- larva de *T. canis* no fígado refrigerado encontrado através da técnica de esmagamento entre lâminas (seta preta); B – Larva de *T. canis* no cérebro refrigerado encontrado através da técnica de esmagamento entre lâminas (seta preta). Microscopia de luz - objetiva de 40x

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Média da contagem diária e desvios padrão (\pm) de larvas (L₂) de *Toxocara canis* durante o período de setes dias no tratamento com *Duddingtonia flagrans* e no controle

Tabela 2: Contagem de Larvas de *T. canis* nos órgãos refrigerados em galinhas inoculados com 5000 ovos embrionados

Tabela 3: Médias e desvio padrão (\pm) das larvas recuperadas em material refrigerado de galinhas com inoculação de 5.000 ovos de *T. canis* tratado com *D. flagrans*, *P. clamydosporia* e controle

Tabela 4: Contagem de Larvas de *T. canis* nos órgãos digeridos com ácidos HCL-Pepsina em galinhas inoculadas com 5000 ovos embrionados

Tabela 5: Média e desvio padrão (\pm) de larvas recuperadas em material digerido com inoculação de 5.000 ovos de *T. canis* tratado com *D. flagrans*, *P. chlamydosporia* e controle

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm: Centímetros

mm: milímetros

ml: Mililitro

Kg: quilograma

‰: Porcentagem

g: grama

°C: grau Celsius

HCL: ácido clorídrico

AA: ágar-água

CMA: corn-meal-ágar

L₂ : Larva do segundo estágio

L₃ : Larva do terceiro estágio

L₄ : Larva do quarto estágio

PI : pós infecção

DPI: Dias após a infecção

AC001: *D. flagrans*

VC4: *P. clamydosporia*

BOD: demanda química de oxigênio

RESUMO

HIURA, Emy; MSc; Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro de 2015; **AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE OVOS DE *Toxocara canis* APÓS AÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS;** Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

O *Toxocara canis* é conhecido comumente como verme redondo do cão, sendo o principal causador da larva migrans visceral em humanos, essa doença tem uma importância zoonótica de distribuição mundial. O controle deste parasito é realizado por meio da utilização de anti-helmínticos, no entanto, já existe relato de resistência parasitária em cães. Nesse sentido e levando em consideração a contaminação do ambiente com ovos de helmintos (*T. canis*), estudos com medidas alternativas de controle são requisitadas. Dessa forma, a utilização de fungos nematófagos é estudada como controle biológico de helmintos. As espécies *Duddingtonia flagrans* e *Pochonia chlamydosporia* têm característica de predação de larvas e ovos de geohelmintos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade predatória dos fungos nematófagos *D. flagrans* (AC001) e *P. chlamydosporia* (VC4) sobre *Toxocara canis* em ensaios *in vitro* (A) e *in vivo* (B). O ensaio A foi composto em teste de predação do fungo *D. flagrans* sobre larvas de segundo estágio de *T. canis* em placa de Petri no intervalo de 7 dias. No ensaio B foram inoculados ovos banhados com fungos (AC001 e VC4) em galinhas. Foram avaliados fígados, intestinos, músculos e pulmões digeridos e nos intervalos de 3, 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade. No resultado do ensaio A realizado nos dias 2, 3, 4, 5 e 6 foi observado diferenças estatísticas ($p < 0,01$) das médias de contagem das larvas do tratado em relação ao controle. O percentual de redução das larvas do ensaio *in vitro* foi de 53,4 %. No ensaio B, o órgão digerido com a maior quantidade de larvas encontradas foi o fígado do dia 21 com a média de $26,9(\pm 2,5)$ larvas. Nos 3, 14 e 21 dias após a infecção obteve uma diferença estatística de ($p < 0,01$) nas médias das contagens de larvas no fígado dos grupos tratados em relação ao controle. Em relação ao pulmão digerido obtiveram diferenças estatísticas em todos os grupos. No intestino houve diferenças estatísticas no dia 3 ($0,2 \pm 0,4$: VC4/ $0,4 \pm 0,5$: AC001/ $1,6 \pm 1,2$: controle), já no dia 7 pós-infecção, houve uma diferença estatística somente na

média do fungo *D. flagrans* ($0,1 \pm 0,3$) com o controle ($0,6 \pm 0,5$). O músculo digerido demonstrou um resultado $p < 0,01$ entre os tratados e o controle do dia 7 ($0,1 \pm 0,3$ /VC4; 0 ± 0 / AC001 e $3,0 \pm 4,2$ / controle), no dia 14 também obteve diferença, mas somente com o fungo *P. chlamydosporia* ($0,2 \pm 0,4$) e o controle ($2,1 \pm 2,3$). O percentual de redução das larvas do ensaio *in vivo* foi de 87,1 % (AC001) e 84,5% (VC4), com estes resultados certificamos a diminuição na quantidade de larvas, e conseqüentemente a migração destes pelos tecidos após a ação dos fungos (AC001 e VC4). Por meio dos valores encontrados no presente trabalho confirmamos a ação dos fungos sobre o *T. canis*, assim podendo indicar o uso destes como uma alternativa do controle biológico servindo para complementar as medidas de prevenção e controle deste nematoide.

Palavras-chave: Helmintos, *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* e controle biológico.

ABSTRACT

HIURA, Emy; MSc; Universidade Vila Velha – ES, February, 2015; ***Toxocara canis* EGGS INFECTIVITY ASSESSMENT POST FUNGI NEMATOPHAGOUS ACTION**; Instructor: Fabio Ribeiro Braga.

Toxocara canis, commonly known as round dog worm, is the main cause for *visceral larva migrans* in humans, this disease has a zoonotic importance of worldwide distribution. The control of this parasite is carried out through the use of anthelmintics, however, there have been reports of parasitic resistance in dogs. In this case, taking into account environmental contamination with helminth eggs (*T. canis*), studies for alternative control measures are required. Thus, the use of nematophagous fungi is being studied as biological control for helminths. *Duddingtonia flagrans* and *Pochonia chlamydosporia* species have a predatory characteristic towards larvae and STH eggs. The main goal of this study was to evaluate the ability of predatory fungi *Nematophagous Duddingtonia flagrans* (AC001) and *Pochonia chlamydosporia* (VC4) on *Toxocara canis* samples *in vitro* (A) and *in vitro* (B). Sample A was based on *T. canis* second-stage larvae at predatory test by *D. flagrans* fungi on Petri plate in a range of 7 days. At sample B, chickens were inoculated with plated fungi eggs (AC001 and VC4). Were evaluated liver, intestines, muscles and digested lungs at intervals 3, 7, 14 and 21 days post inoculation. The data were interpreted statistically by variance analysis at significance levels of probability 1 and 5%. Sample A results held on days 2, 3, 4, 5 and 6 were observed statistical differences ($P < 0.01$) overall count of treated larvae compared to controlled. The percentage of larvae reduction found *in vitro* sample was 53.4%. In sample B, the organ digested with the largest number of larvae found was the liver from day 21 with an average of $26.9 (\pm 2.5)$ larvae. A statistical difference ($p < 0.01$) was obtained within average larval counts in the liver of the treated groups compared to controlled groups on days 3, 14 and 21 post infection. Regarding the digested lung were found statistical differences in all groups. In the intestine there were statistical differences in day 3 (0.2 ± 0.4 : VC4 / 0.4 ± 0.5 : AC001 / 1.6 ± 1.2 : control), whereas on day 7 post-infection was found a statistical difference only in the average fungus *D. flagrans* (0.1 ± 0.3) with control (0.6 ± 0.5). The digested muscle demonstrated a result $P < 0.01$ between

treated and controlled groups on day 7th (0.1 ± 0.3 / VC4; 0 ± 0 / AC001 and 3.0 ± 4.2 / control) and on day 14th also obtained significant difference, but only with the fungus *P. chlamydosporia* (0.2 ± 0.4) and control (2.1 ± 2.3). The reduction percentage in the *in vivo* sample of larvae was 87.1% (AC001) and 84.5% (VC4), with these results we certify the decrease in the larvae number, and thus their migration into tissues after the action of fungi (AC001 and VC4). Through the values accessed in this study we confirm the action of fungi on *T. canis*, and suggest using these values as an alternative to biological control and serving to complement the preventive and control measures of this nematode.

Key Words: Helminths, *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and biological control.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	VI
Lista de Tabelas.....	VII
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract.....	XI
1.Introdução	1
2.Revisão de Literatura	3
2.1 <i>Toxocara canis</i>	5
2.2 Síndrome Larva Migrans Visceral.....	5
2.3 Controle de helmintos em Pequenos Animais.....	6
2.4 Controle Biológico.....	7
2.4.1 <i>Duddingtonia flagrans</i>	8
2.4.2 <i>Pochonia clamydosporea</i>	9
3. Objetivos.....	10
4. Metodologia.....	11
4.1 Obtenção e Manutenção Laboratorial dos ovos de <i>Toxocara canis</i>	11
4.2 Obtenção dos Isolados.....	11
4.3 Ensaio Experimental A.....	12
4.4 Ensaio Experimental B.....	13
5. Resultados e Discussão.....	15
5.1 Experimento A.....	15
5.2 Experimento B.....	20
5.2.1 Material Refrigerado.....	21
5.2.2 Material digerido.....	23
6. Conclusão.....	29
7. Bibliografia.....	30

1. Introdução

O *Toxocara canis* é conhecido comumente como verme redondo do cão e é classificado taxonomicamente no filo Nematoda, ordem Ascaridida e família Toxocaridae (NCBI, 2013). É o principal causador da larva migrans visceral em humano, importante zoonose de distribuição mundial. Os cães albergam a forma adulta do parasito no intestino delgado, eliminando os ovos no ambiente, quando ingeridos por humanos (Taylor, Coop, Wall 2010), mamíferos e aves tais como galinhas, liberam as larvas no intestino e estas realizam a migração tecidual, sem completar o ciclo ou evoluir de estágio (Rey, 2011).

As galinhas (*Gallus gallus domesticus*), ao ingerirem os ovos do nematóide, se tornam hospedeiros paratênicos e podem infectar o homem por meio da ingestão dos seus tecidos crus ou mal cozido, principalmente pela ingestão de fígado, pulmão e músculo (Rey, 2011). Morimatsu et al. (2006) relatou uma infecção de *Toxocara canis* em humano por meio da ingestão de fígado de galinha mal cozido, esse relato foi em dois adultos da mesma família. Nesse estudo foi possível a recuperação e quantificação das larvas nas vísceras demonstrando que as galinhas podem se infectar a partir da ingestão de ovos embrionados de *T. canis* e *Toxocara cati* (Taira, Permim, Kapel, 2003; Taira, Saitoha, Kapel, 2011).

Dentre as medidas de combate a este nematóide estão à restrição do acesso de cães a parques, praças e praias, visto que os casos mais graves acontecem em crianças menores de 3 anos de idade, que são mais expostas ao contato com o solo e mais vulneráveis a falhas na higiene pessoal (Hallack e Cunha, 2009). Nesse sentido, o tratamento dos cães parasitados é parte relevante no controle e na prevenção da infecção helmíntica, uma vez que determina a eliminação dos vermes adultos. O tratamento pode ser realizado com anti-helmínticos como a piperazina, fembendazol, mebendazol, nitroscanato, pirantel, avermectina ou selamectina (Taylor; Coop; Wall, 2010). A resistência parasitária a anti-helmíntica em cães foi demonstrado por Koop et al. (2008), onde comprovou a resistência de pirantel em *Ancylostoma caninum*. Em relação ao *T. canis*, Carvalho em 2004 fez experimentos com uso de fembendazol e pamoato de pirantel para testar a eficácia destes anti-

helmínticos em *T. canis*. Concluiu que ainda não há resistência de *T. canis* em relação a estes medicamentos, mas comprovou que a dose comercial recomendada anteriormente não é mais eficaz para o seu controle, demonstrando uma progressão negativa em direção a resistência parasitária.

Outros estudos também demonstram a importância de que medidas alternativas ao controle químico devem ser mais exploradas, como por exemplo, os trabalhos que relatam o controle biológico por meio da ação predatória e ovicida de organismos naturais como os fungos nematófagos. (Hallack e Cunha, 2009; Frassy et al., 2010; Carvalho et al, 2010). Como por exemplo, Araujo et al., (2012) que relatou pela primeira vez a passagem do fungo nematófago ovicida *Pochonia chlamydosporia* pelo trato gastrointestinal de cães para o controle de ovos de *Toxocara canis*. Foi introduzido o fungo *P. chlamydosporia* na ração dos cães, e as fezes foram coletadas e analisadas por meio de um microscópio eletrônico em diferentes horários (6, 12, 24, 36 e 48 horas). Observou um percentual de redução 28,6% (6 horas); 29,1% (12 horas); 32% (24 horas); 31,7% (36 horas) e 37,2 % (48 horas).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre fungos predadores em ensaios experimentais *in vivo*. E o presente trabalho é uma pesquisa pioneira, pois é o primeiro relato da ação de fungos nematófagos (*D. flagrans* e *P. chlamydosporia*) sobre as larvas e ovos de *T. canis* em *G. g. domesticus* como modelo experimental, assim justifica-se a realização deste trabalho a fim de esclarecer o mecanismo de ação de fungos nematófagos (*D. flagrans* e *P. chlamydosporia*) sobre a atividade migratória de larvas do terceiro estágio L₃ em galinhas e o seu sucesso pode contribuir para a diminuição da infecção de *Toxocara canis* em galinhas e conseqüentemente em humanos que ingerem esse tecido.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Toxocara canis*

O *Toxocara canis* foi descoberto em 1782 pelo Werner, primeiramente nomeado como *Ascaris marginata*, mas no século XIX foi identificado como *Toxocara canis*, nomenclatura utilizada atualmente (Sprent, 1958). O *Toxocara canis* é um parasita intestinal de cães e raposas, é o principal agente etiológico da larva migrans visceral, já o *Toxocara cati* ou *Toxocara mystax* é um parasita encontrado principalmente em gatos, porém apresenta importância secundária na doença (Rey, 2011; Taylor, Coop, Wall, 2010).

As fêmeas de *T. canis* são maiores que os machos, com variações de 9 a 18 cm e 4 a 10 cm, respectivamente. Possuem corpo robusto e esbranquiçado, asa cervical estreita e proeminente, em formato de lança, que se estende até a extremidade posterior do esôfago e o macho possui um processo digitiforme da cauda (Taylor, Coop, Wall, 2010).

As fêmeas podem produzir 2 milhões de ovos por dia na época mais fértil da sua existência, entre a sétima até 28ª semana (Rey, 2011).

Os cães são os hospedeiros definitivos do *T. canis* e eliminam os ovos não larvados nas fezes (Monteiro, 2010). Em condições ambientais favoráveis, com aproximadamente 28 dias a larva atinge seu estágio infectante (L₃). Essas formas podem permanecer viáveis por meses até serem ingeridas por outros hospedeiros (Lima, 2007). A infecção nos cães pode ocorrer pela ingestão dos ovos no ambiente ou pela via transplacentária e transmamária. A ingestão dos ovos contendo L₃ leva a eclosão das larvas no intestino, as larvas atravessam a mucosa e por meio da corrente sanguínea migram para o fígado e pulmões. Nos pulmões realizam uma muda, transformam-se em L₄ e posteriormente seguem para a traquéia, são deglutidas e levadas ao intestino delgado. Neste local sofrem a última muda, transformando-se nas formas adultas. Geralmente, este padrão de migração ocorre em cães de dois a três meses de idade. Em cães com mais de quatro a seis meses de idade ocorre à migração somática em fígado, pulmões, cérebro e musculatura esquelética, seguida de hipobiose das larvas (Taylor; Coop; Wall, 2010).

Segundo Monteiro (2010) a forma de infecção mais importante nos cães é a que ocorre via transplacentária onde as larvas são reativadas pelas alterações hormonais e chegam aos pulmões do feto, sofrendo uma muda um pouco antes do parto. Então, após o nascimento, as larvas migram para o intestino através da traquéia e completam o ciclo. Já na infecção transmamária por ingestão das L₃ nas três primeiras semanas da lactação, não há migração e as larvas desenvolvem-se diretamente no intestino do filhote (Taylor; Coop; Wall, 2010).

Em infecções pré-natais maciças há um desconforto abdominal grave nos filhotes que podem eliminar os parasitos no vômito e nas fezes e ainda vir a óbito por ruptura ou obstrução intestinal devido ao grande número de espécies (Bowman, 2006). Pneumonia, edema pulmonar e enterite mucoide também podem estar presentes no quadro clínico (Taylor; Coop; Wall, 2010).

O ovo de *T. canis* pode ser ingerido por inúmeros animais dentre eles estão camundongos, ruminantes, ratos, ovinos, suínos, aves (galinhas e patos) e até o homem. No hospedeiro paratênicos, após a ingestão de ovos embrionados, as larvas são liberadas e penetram na parede do intestino delgado, atingem a circulação sanguínea (veia porta) e linfática, vão em direção ao fígado, em seguida ao pulmão e posteriormente ao músculo e cérebro (Hoffmeister et al., 2007; Flecher, 2010). As larvas depois que migram para diversos tecidos permanecem em quiescência, assim estes hospedeiros servem como fontes de infecção no caso da ingestão de seu tecido cru a mal cozido (Lima, 2007). Estudos realizados por Galvin et al.,(1964) e Taira, Permin e Kapel (2003) utilizaram galinhas como modelo experimental, infectaram com ovos embrionados de *Toxocara* spp e após necropsia observaram larvas em maior quantidade no fígado e pulmão. Porém, em estudo semelhante realizado por Maruyama et al. (1994), larvas de *Toxocara* spp. foram encontrados em maior quantidade no fígado e músculo.

Como a quantidade de larvas de *T. canis* permanece em alta quantidade por um longo período no fígado da galinha, a ingestão de fígado cru ou mal cozido é um das formas de infecção em humanos adultos (Taira, Permin e Kapel, 2003; Morimatsu, 2006). Segundo Rey, 2011, as crianças constituem o principal grupo de risco, devido ao hábito de colocar as mãos e objetos na boca

como areia contaminada. Segundo Moreira-Silva et al., (1998) foi feita uma pesquisa sorológica em crianças hospitalizadas no Espírito Santo que resultou em 39% de soropositividade para *T. canis*.

2.2 Síndrome larva migrans visceral

Nos humanos o *Toxocara canis* não atinge a maturidade, mas as larvas podem permanecer ativas, migrando erraticamente pelos órgãos causando uma síndrome chamada de larva migrans visceral (Rey, 2011).

Esta doença é caracterizada pela migração das larvas de terceiro estágio de *T. canis* nos tecidos causando uma inflamação em diversos órgãos, como fígado, pulmões, cérebro, olhos (larva migrans ocular) e linfonodos gerando a lesão típica de granuloma alérgico. Os casos podem ser clinicamente leves, graves ou fatais e manifestarem-se com tosse, dispneia, asma brônquica, febre, eosinofilia persistente, hepatomegalia, hepatite, nefrose, epilepsia, meningite e encefalite. Quando a localização é ocular, é possível a perda da visão devido ao descolamento da retina e à opacificação do humor vítreo (Robertson, Thomson 2002; Rey, 2011).

Segundo Rey (2011), as crianças são mais acometidas pela larva migrans visceral. Os fatores de risco são: contato com cães infectados por *T. canis*, o hábito de não lavar as mãos antes das refeições e uso de parques públicos (Núñez et al., 2013). Outra maneira de contaminação é a ingestão de larvas presente nos tecidos de hospedeiro paratênicos como fígado cru ou mal cozido, visto principalmente em adultos (Rey, 2011).

2.3 Controle de helmintos em pequenos animais

Os helmintos são divididos em dois grupos, o grupo dos chamados vermes redondos (*Nemathelminthes*) que engloba a classe *Nematoda*, e o grupo dos vermes chatos (*Platyhelminthes*) formado pelas classes *Trematoda* e *Cestoda* (Monteiro, 2010). O *T. canis* pertence à Classe *Nematoda* e família *Ascaridoidea*, e é responsável por infectar cães principalmente em filhotes (Bowman, 2010).

A principal medida de controle é prevenir a transmissão transplacentária e transmamária, e este tratamento é feito com anti-helmíntico na cadela e nos filhotes. Ao completar duas semanas de vida os filhotes devem

ser medicados com anti-helmínticos, com repetição da medicação 2 a 3 semanas depois. Para garantir a eliminação da infecção adquirida através do leite, outra dose de anti-helmíntico deve ser administrada com dois meses de vida. Em cães adultos é recomendável que o controle seja feito a cada três ou seis meses. Além do controle medicamentoso, a limpeza adequada das fezes é uma importante medida para diminuição da contaminação ambiental por ovos e, conseqüente, da possibilidade de reinfecção e infecção dos cães (Carvalho 2004; Taylor; Coop; Wall, 2010).

O anti-helmíntico é a forma mais comum para o controle de vermes que infectam os animais domésticos, principalmente em cães, mas atualmente vem crescendo uma preocupação da população em relação à contaminação ambiental causada pelo uso desses medicamentos (Araujo et al., 2004b; Braga et al., 2010b). Dessa forma a utilização de alternativa de controle no uso integrado com o controle químico pode diminuir o impacto ambiental. Dentre essas alternativas estão os fungos nematófagos para o controle biológico, este pode ser uma ferramenta promissora (Braga et al., 2011b).

2.4 Controle Biológico

O controle biológico com utilização de fungos nematófagos é uma forma viável de controle de helminto, que tem como intenção o seu uso em conjunto com o anti-helmíntico (Araújo et al., 2010; Braga et al., 2010b).

O Controle biológico é a utilização de competidores naturais que estão disponíveis no ambiente e que tenham capacidade para diminuir uma determinada população de agente agressor até uma quantidade aceitável. (Gronvold et al., 1996).

Já foram descritos vários antagonistas naturais como controladores biológicos de helmintos, tais como protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos (Graminha, 2004). Os fungos nematófagos atraem a atenção de pesquisadores (Araujo et al., 2004a), desde que sua função como predador de nematóides foi reconhecida no final do século XIX por Zopf, em 1888 (Gray, 1988). Os fungos nematófagos são cosmopolitas e ocorrem em solos naturais, solos agricultáveis e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição. No ambiente, esses fungos agem na reciclagem de carbono,

nitrogênio (Graminha, 2004) e também podem capturar e destruir os nematóides (Braga et al., 2009a).

O fungo nematófago é classificado por meio da sua morfologia e as características funcionais que estão associadas com a produção de estruturas especializadas para a captura de helmintos. São divididos em três grupos: os ovicidas, que atuam em ovos, por meio da penetração da hifa na casca do ovo ou cutícula; os endoparasitas, que atuam em larvas e adultos através da ação de conídios adesivos ou que precisam ser ingeridos; e os predadores, que agem através da formação de estruturas ao longo das hifas especializadas em capturar os nematóides (Barron, 1977; Araújo et al., 2004).

2.4.1 *Duddingtonia flagrans*

O gênero *Duddingtonia* é um fungo predador que se caracteriza pela produção de vários conídios na extremidade dos conidióforos e produz armadilhas de redes tridimensionais. A presença do helminto induz à produção de armadilhas. De acordo com Sanyal et al.,(2004) e Terril et al., (2004), *D. flagrans* é utilizado com sucesso no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos devido ao grande número de clamidósporos produzidos e a alta resistência dessas estruturas às condições adversas. Segundo Araújo et al. (2004), o gênero *Duddingtonia* sp. pertence ao grupo dos fungos nematófagos predadores produzem diferentes tipos de armadilhas: hifas adesivas; hifas ramificadas, hifas adesivas tridimensionais e anéis constritores entre outros. Estruturas de captura são produzidas em resposta aos estímulos externos, como a presença do nematóide, (dependente da sua quantidade, motilidade e produção de substâncias), luminosidade, presença de água e o estado nutricional do isolado fúngico.

A interação do fungo com o nematóide é um processo complexo, os eventos pontuais são: adesão das estruturas na superfície do nematóide; penetração da cutícula; imobilização; invasão e digestão de tecidos internos (Yang et al., 2005). Após a captura dos nematóides por meio da armadilha, o processo de adesão se inicia com o contato físico entre a superfície do nematóide e a armadilha. Este contato conduz a diferentes eventos que incluem a ativação de receptores lectinicos (que reconhecem carboidratos do parasito), à modificação dos polímeros de superfície e secreção de enzimas

específicas resultando em uma ligação firme entre o nematóide e o fungo (Rosén et al.,1991). Em seguida, o fungo penetra na cutícula e inicia o desenvolvimento da hifa ao longo do corpo do nematóide, ocasionando uma alteração das funções vitais e conseqüentemente a morte do parasita (Drechsler, 1937). Estudos têm sugerido que a penetração da cutícula do nematóide envolve uma combinação da atividade mecânica e a atividade de enzimas hidrolíticas incluindo proteases, quitinases e colagenases (Wang et al., 2006).

2.4.2 *Pochonia chlamydosporia*

As espécies *Pochonia chlamydosporia* é representante de fungos com atividade ovicida, importante fenômeno que acontece a partir do parasitismo nos ovos (Araujo et al., 2009; Braga et al., 2011a). A hifa penetra no ovo por pequenos poros da camada vitelínica da casca, provocando uma alteração na permeabilidade e expansão em seu volume com colonização do conteúdo do ovo (Araújo et al., 2004).

O fungo *P. chlamydosporia* parasita a superfície do ovo e coloniza o interior do ovo de helminto por ações enzimáticas em conjunto com atividade mecânica (Araujo et al., 2004).

Lysek (1976) estabeleceu um método qualitativo para classificar a atividade ovicida em: efeito do tipo 1, efeito lítico sem alteração morfológico à casca e hifas aderidas à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo (Lysek e Sterba, 1991).

Assim, o fungo *P. chlamydosporia* é um dos mais estudados atualmente para o controle de helmintos nocivos para à agricultura (Araujo et al., 2008; Braga et al., 2008).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de migração larval de *Toxocara canis in vitro e vivo* após o tratamento dos ovos embrionados com os fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Pochonia clamydosporia*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar eficiência de conídios de *D. flagrans* e *P. chlamydosporia* no controle de ovos de *T. canis*.
- Avaliar a ação do fungo *D. flagrans* sobre larva de segundo estágio de *T. canis* após 7 dias de experimento *in vitro*.
- Avaliar a migração larval de *T. canis* nos órgãos de galinhas após os 3, 7, 14 e 21 dias após a infecção.

4. Metodologia

4.1 Obtenção e manutenção laboratorial dos ovos de *Toxocara canis*

Os ovos de *T. canis* foram obtidos através da dissecação de fêmeas adultas, eliminadas nas fezes de cães naturalmente infectados. Os ovos foram lavados com ácido sulfúrico 0,1 N (normal), filtrado com peneira de náilon e conservado em temperatura ambiente. Posteriormente, mantidos em estufa BOD (Demanda química de oxigênio) a 28°C neste mesmo meio, até se tornarem embrionados. Semanalmente o ácido sulfúrico 0,1 N (normal) foi repostado para que não houvesse ressecamento dos ovos (Flecher, 2010). Quando atingiram mais de 70% de embrionamento foi iniciado o experimento. Três lavagens com salina isotônica foram feitas anteriormente à inoculação experimental.

4.2 Obtenção dos isolados

Foram utilizados dois isolados de fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Pochonia clamydosporea* (VC4). Esses isolados são originados de solo do Brasil, e são provenientes do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa. Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e no escuro durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9cm diâmetro contendo 20mL de ágar-água 2% (AA 2%) onde foram acrescidos de 1mL de água destilada contendo 1.000 larvas de *Panagrellus* sp, nematoide de vida livre, diariamente durante um período de 21 dias para indução da formação de conídios fúngico. Quando se observou o completo desenvolvimento fúngico, 5mL de água destilada foram adicionados a cada placa de Petri, sendo que os conídios e fragmentos miceliais foram removidos segundo a técnica descrita por Araújo et al., (1993).

4.3 Ensaio Experimental A

A obtenção das larvas de *T. canis* foi extraída com o uso de pérolas de vidro em frasco de Erlenmeyer, com solução contendo ovos embrionados de *T. canis* em agitação constante.

Dois grupos foram formados em placas de Petri de 9,0cm de diâmetro contendo 20 mL de AA 1%, um grupo tratado e um grupo controle, sendo feitas 6 repetições para cada grupo. Nos grupos tratados cada placa de Petri continha 500 L₂ de *T. canis* e 500 conídios do isolado fúngico *D. flagrans* em meio de cultura com AA 1%, e o grupo controle (sem fungos) continha apenas 500 L₂ *T. canis* nas placas com AA 1% de acordo com Braga et al. (2013) modificado. Durante sete dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4 mm de diâmetro em cada placa dos grupos tratados e controle foram observados em microscópio óptico em objetiva de 10x, contando-se o número de L₂ não predadas em cada um. Ao final de sete dias, foram recuperadas as L₂ não predadas do conteúdo das placas de Petri através do aparelho de Baermann com água a 42°C (Braga et al., 2010b).

Análise Estatística

A média de L₂ de *T. canis* foi calculada. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade (Ayres et al., 2003). A eficiência de predação de L₃ em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade. Posteriormente, o percentual de redução da média de L₂ foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Redução} = \frac{\text{Média de L}_2 \text{ recuperadas do controle} - \text{Médias de L}_2 \text{ recuperadas do tratamento}}{\text{Média de L}_2 \text{ recuperadas do controle}} \times 100$$

4.4 Ensaio Experimental B

Animais

Vinte e quatro animais (*Gallus gallus domesticus*) com aproximadamente três semanas de idade foram obtidas de granja comercial. A seguir, os animais foram divididos em 4 grupos de acordo com o dia em que seriam eutanasiados (3, 7, 14 e 21 dias), separando 6 animais para cada grupo. Cada grupo foi dividido em: grupo tratado com 4 aves e grupo controle com 2 aves. Os animais foram mantidos em gaiolas de 42cm de altura, 65cm de largura e 70cm de comprimento e receberam ração duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

A interação do ovo de *T. canis* com os fungos *D. flagrans* e *P. chlamydosporia* foi feita durante 10 dias utilizando-se 20.000 clamidósporos e 5000 ovos embrionados de *T. canis*. No grupo tratado, duas galinhas foram inoculadas com ovos obtidos da interação com *D. flagrans* e duas galinhas com ovos obtidos da interação com *P. chlamydosporia*. O grupo controle foi infectado com ovos embrionados sem o tratamento com fungos nematófagos (Braga et al.,2009b; Frassy et al.,2010).

Após a inoculação os animais foram observados duas vezes ao dia para que possíveis alterações clínicas fossem registradas. Com 3, 7, 14 e 21 dias após a infecção, as aves foram eutanasiadas por eletrocussão precedida de anestesia geral intravenosa com tiopental 10% na dose de 2 mL/kg (Fantoni, Cortopassi, Bernardi, 1999).

Contagem das larvas nos órgãos refrigerados e digeridos.

Após a eutanásia, foram coletados materiais (fígado, cérebro, músculo, intestino e pulmão) de cada animal. O cérebro foi separado em sacolas plásticas e refrigerado. O fígado foi dividido em duas partes, uma para refrigeração e outra para congelamento. O restante dos órgãos foi separado para congelamento.

Os órgão que foram refrigerados (foram acondicionados individualmente em sacolas plásticas sob-refrigeração em 4°C e posteriormente esmagado entre duas lâminas de vidro de 5 cm por 9 cm e visualizados em microscopia óptica no aumento de 40 vezes. A análise do fígado e cérebro foi feita através

do esmagamento entre duas lâminas de vidro 5 cm por 9 cm e visualizados em microscopia óptica no aumento de 40 vezes.

Os materiais que foram congelados foram acondicionados em sacolas plásticas individuais e foram congelados a aproximadamente -20 °C até a análise. Os órgãos congelados foram analisados através da digestão com ácidos. O fígado, músculo, pulmão e intestino foram digeridos separadamente em HCL- pepsina [1% HCL (37%), 1% pepsina 1: 10.000 formulado em água natural] a 46°C por 2 horas em constante agitação. A proporção entre o tecido (g) e o ácido (ml) foi de 1:10. Logo após a digestão as amostras foram filtradas em uma peneira de diâmetro (0,02mm) e foram analisados na placa de Petri no microscópio de dissecação (Taira et al., 2003; Taira et al., 2012).

Número do parecer de aprovação pelo Comitê de Ética (CEUA): 284/13

5. Resultados e Discussão

5.1 Experimento A

No dia 2 ao dia 6 foram observadas que as médias das contagens das larvas do controle foram superiores aos grupos tratados (AC001), e foi observada uma diferença estatística significativa $p < 0,01$ (Tabela 1). Isso reforça a ação predatória do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de *T. canis*. Estes valores corroboram com os dados encontrados por outros autores, que analisaram a atividade nematicida de isolados fúngicos da mesma espécie, porém sobre outra espécie de nematóide.

Mello et al. (2014) demonstraram a ação predatória do fungo do gênero *Duddingtonia* (CG768) em larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. *in vitro*. Foram realizado ensaio com diferentes concentrações de clamidósporos (5.000 a 25.000) do fungo sobre 1.000 larvas de *Ancylostoma* spp. em 15 dias. A diferença estatística ($p < 0.01$) foi observada nas concentrações de 15.000, 20.000 e 25.000 clamidósporos em relação ao grupo controle.

Carvalho et al. (2009) fez experimento *in vivo* com cães e avaliou a capacidade predatória de *D. flagrans* após a passagem pelo trato digestório, encontrando resultados que confirmam que o fungo permanece com sua a sua capacidade predatória e se mostrou eficiente na predação ($p < 0,05$) até 48 horas após sua administração no cão. Ele também avaliou a atividade predatória do fungo *D. flagrans* sobre larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* sp. em condições laboratoriais, encontrando um percentual de redução de 87,0%.

Tabela 1: Média da contagem diária e desvios padrão (\pm) de larvas (L_2) de *Toxocara canis* durante o período de setes dias no tratamento com *Duddingtonia flagrans* e no controle

Fungos	Tempo (Dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
AC001	10,1 ^A \pm 4,3	7,0 ^A \pm 4,9	7,9 ^A \pm 4,2	6,7 ^A \pm 5,3	5,5 ^A \pm 4,8	4,5 ^A \pm 4,4	6,2 ^A \pm 3,3
Controle	8,5 ^A \pm 4,7	8,7 ^B \pm 3,3	10,5 ^B \pm 4,8	9,0 ^B \pm 3,5	9,4 ^B \pm 3,6	6,3 ^B \pm 2,9	6,6 ^A \pm 3,3

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente ($p < 0,01$) – Teste de Tukey; AC001: *Duddingtonia flagrans*

Não houve diferença estatística entres as médias das larvas contadas no dia 1 e 7 do experimento (Tabela 1). No dia 1, obteve o resultado da média e desvio padrão de $10,1 \pm 4,3$ no tratado e $8,5 \pm 4,7$ no controle. E a média e o desvio padrão no dia sete foi de $6,2 \pm 3,3$ no tratado e $6,6 \pm 3,3$ no controle. Esse resultado pode ser justificado pela pouca motilidade das larvas L_2 quando comparada com a motilidade das L_3 . Relacionado a isso, a literatura menciona que quanto maior a motilidade, maior é o estímulo do fungo para produção de armadilhas e na captura dos nematoides (Nansen et al. 1988). Segundo Braga et al. (2010b) no sétimo dia há uma diminuição da umidade nas placas e que as larvas migram para periferia em busca de mais umidade, dificultando a visualização e a contagem das larvas, o que justificaria a diminuição do número de larvas no grupo controle. Outra possível hipótese seria a de que houvesse uma menor interação do fungo com as larvas L_2 quando comparada com a interação que ocorre entre o fungo e as L_3 . Segundo Braga et al., (2010a) há uma maior interação da lectina com o carboidrato em larva de terceiro estágio, devido a sua dupla cutícula, mas essa interação é um processo complexo e ainda não é muito bem explicada por completo (Balogh et al., 2003).

No presente trabalho com auxílio de microscópio óptico observou-se as larvas L_2 de *T. canis* sendo predadas pelo fungo *D. flagrans*. Foi possível visualizar a presença de clamidósporos na superfície larval (Figura 1- A) e a presença de hifas dentro e fora das larvas (Figura 1- C e D). A quantidade de

hifas foi aumentando no interior das larvas ao longo dos 7 dias do experimento, por fim degradando-a por completo.

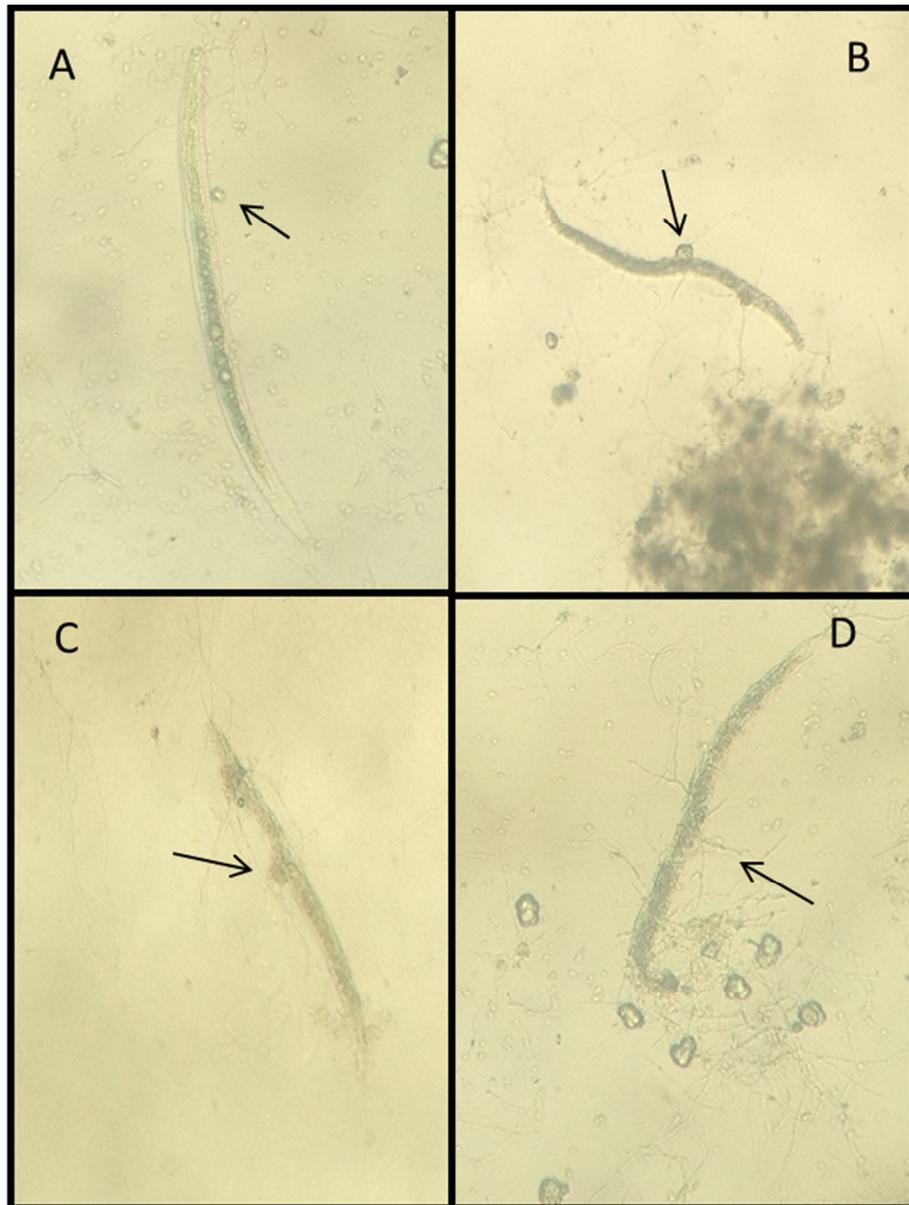


Figura 1: A - Larva de segundo estágio (L₂) de *T. canis* com presença de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* na superfície (seta preta). B e C - Larva (L₂) de *Toxocara canis* com presença de clamidósporos e hifas do fungo *Duddingtonia flagrans*, com alteração morfológica da larva (seta preta). D - Larva (L₂) de *T. canis* destruída com presença interna de hifas do fungo *Duddingtonia flagrans* (seta preta). Microscopia de luz - objetiva de 10x.

No presente experimento a presença das larvas nas placas de Petri contendo AA1% foi essencial para a formação de hifas pelo fungo, uma vez que este meio é pobre em nutrientes, assim poderia utilizar somente as larvas como fonte de nutrição (Araujo et al., 2004 a e b; Maciel et al., 2006). Se o meio de cultura fosse rico em carbono e nitrogênio, isso impossibilitaria a mudança do saprofitismo para uma habilidade predatória e conseqüentemente pouca ou nenhuma produção de armadilha (Scholler; Rubner, 1994).

A comprovação da predação do experimento A foi observado pelo percentual de redução das L₂ pelo fungo *D. flagrans* (54,3%). Em trabalho realizado por Braga et al. (2013), no qual comparou-se a atividade de dois isolados fúngico de *D. flagrans* (AC001 e CG722) sobre larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*, encontraram-se valores de percentual de redução de 74,5% e 63,2% respectivamente. Mello et al. (2014) ao analisar a capacidade predatória do gênero *Duddingtonia* (CG768), com 25.000 clamidósporos sobre 500 larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* sp. *in vitro*, encontrou o percentual de redução de 84% ao final de 7 dias de experimento.

5.2 Experimento B

5.2.1 Materiais refrigerados

A contagem de larvas no fígado e cérebro refrigerado foi analisada através do esmagamento entre duas lâminas de vidro e visualizada em microscopia óptica no aumento de 40 vezes como mostra na Figura 2.

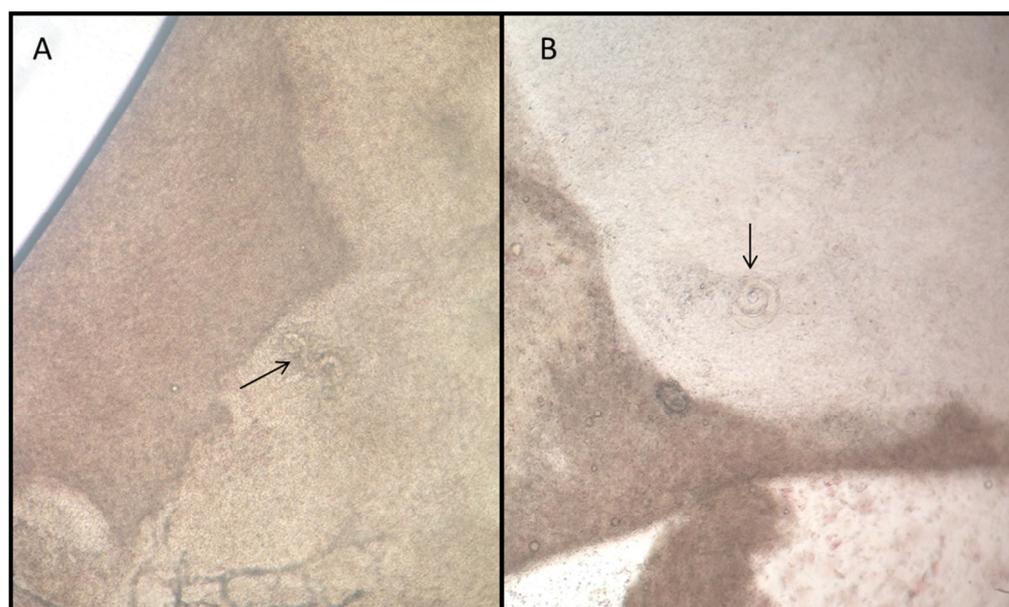


Figura 2: A- larva de *T. canis* no fígado refrigerado encontrado através da técnica de esmagamento entre lâminas (seta preta); B – Larva de *Toxocara canis* no cérebro refrigerado encontrado através da técnica de esmagamento entre lâminas (seta preta). Microscopia óptica - objetiva de 40x

Foram visualizadas larvas nos órgãos refrigerados, tanto no fígado como no cérebro. O órgão refrigerado com maior quantidade de larvas contadas foi o fígado, do grupo controle com 21 dias após infecção. Enquanto que no cérebro iniciou o aparecimento de larvas no dia 14 após infecção (Tabela 2). No fígado com 3 dias após a infecção, foram encontradas no grupo dos tratados 2 larvas (VC4), 4 larvas (AC001) e 9 larvas no controle. Nenhuma larva foi encontrada no cérebro nos dias 3 e 7 após infecção. Em 7 dias após a infecção em todos os grupos foram encontradas somente 1 larva por grupo. No fígado com 14 dias após a infecção foram encontradas no grupo tratado 3 larvas (VC4), 4 larvas (AC001) e 36 larvas no controle. E pela primeira vez foi

encontrada 5 larvas no cérebro do grupo controle. No grupo tratado com 21 dias após a infecção no fígado foram encontradas 12 larvas (VC4) e 8 larvas (AC001). No grupo controle no fígado foram encontradas 77 larvas. E no cérebro com 21 dias após a infecção foram encontradas 2 larvas (VC4), 0 larvas (AC001) e 11 larvas no controle (Tabela 2).

Tabela 2: Contagem de larvas de *Toxocara canis* total nos órgãos refrigerados em galinhas inoculados com 5000 ovos embrionados

Dias PI	Grupos	Total de larvas	Fígado	Cérebro
3	Controle	9	9	0
3	VC4	2	2	0
3	AC001	4	4	0
7	Controle	1	1	0
7	VC4	1	1	0
7	AC001	1	1	0
14	Controle	41	36	5
14	VC4	3	3	0
14	AC001	4	4	0
21	Controle	88	77	11
21	VC4	14	12	2
21	AC001	8	8	0

DPI: Dias após a infecção; AC001- *Duddingtonia flagrans*; VC4- *Pochonia clamydosporia*

O fígado refrigerado foi analisado, nos dias 3, 14 e 21 encontrou-se diferença estatística ($p < 0,01$) entre as médias do grupo tratado e controle. Portanto, a quantidade de larvas recuperadas no tratado foi menor que as recuperadas no grupo controle comprovando a ação dos fungos.

O resultado da ação dos fungos nematófagos, *D. flagrans* e *P. Clamydosporia*, foi semelhante ao encontrado em trabalhos realizados com outros helmintos. Braga et al., (2013) demonstraram a ação do fungo do gênero *Duddingtonia* (AC001 e CG722) sobre larvas de primeiro estágio do *Angiostrongylus vasorum* em condições laboratoriais. Foi realizado experimento com 500 clamidósporos dos isolados fúngicos sobre 500 larvas de *A. vasorum* em 7 dias de experimento. No final, as larvas foram recuperadas através da técnica de Baermann e por fim foi calculada a taxa de redução. Houve diferença estatística ($p < 0.01$) nos dois isolados fúngicos (AC001 e

CG722) em relação ao controle e o percentual de redução foi de 74,5% no AC001 e 63,2% no CG722.

Frassy et al., (2010) avaliaram a eficácia do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Toxocara canis* em condições laboratoriais e obtiveram um percentual de atividade ovicida de 43,8%, compararam o grupo tratado com o grupo controle ($p < 0,01$). Em experimento realizado por Soares et al. (2014) foi observado a ação ovicida do fungo *P. chlamydosporia* (VC4) sobre o ovo de *Dioctophyma renale* em condições laboratoriais. O número de ovos destruídos no grupo tratado ($p < 0,01$) confirmou sua atividade ovicida quando comparado ao grupo controle.

Na avaliação do fígado resfriado no dia 7 não foi observada diferença entre os grupos tratados ($0,1 \pm 0,3$) e o controle ($0,1 \pm 0,3$). Esse resultado do controle pode ser justificado por três hipóteses: (1) houve uma migração larval do *T.canis* do fígado para o pulmão tardiamente, (2) ocorreu uma distribuição não homogênea das larvas no fígado na hora da contagem, pois a leitura é feita com 30% do peso total do fígado, o que corresponde aproximadamente a uma amostra de 6 g e (3) pode ter ocorrido uma migração e redistribuição das larvas para os vasos sanguíneos se deslocando em direção a algum órgão. Esse fenômeno só foi descrito em camundongos inoculados em baixa quantidade de ovos embrionados (Maruyama et al., 1994).

Houve diferença estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados em relação aos controles nas médias das contagens de larvas do cérebro do dia 14 e 21. E não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados (AC001 e VC4) e controle, nas médias dos dias 3 e 7 após infecção (Tabela 3).

Esse resultado do controle foi diferente do trabalho realizado por Taira, Permin e Kapel (2003), que inocularam diferentes concentrações (5.000, 10.000 e 20.000) de ovos de *Toxocara canis* em galinhas no intervalo de 1, 3 e 6 dias. No resultado foram encontradas 5 larvas após 3 dias de infecção em galinha inoculada com 10.000 ovos de *T. canis*. Essa diferença de resultado da migração larval para o cérebro pode estar relacionado com a quantidade de ovos inoculados na galinha, pois no trabalho citado acima utilizou-se o dobro da concentração comparado ao presente trabalho.

Tabela 3: Médias e desvio padrão (\pm) das larvas recuperadas em materiais refrigerados de galinhas com inoculação de 5.000 ovos de *Toxocara canis* tratado com *Duddingtonia flagrans*, *Pochonia clamydosporia* e controle.

Dias PI	Grupos	Média e Desvio Padrão	
		Fígado	Cérebro
3	Controle	0,9 ^B \pm 0,3	0 ^A \pm 0
3	VC4	0,2 ^A \pm 0,4	0 ^A \pm 0
3	AC001	0,4 ^A \pm 0,5	0 ^A \pm 0
7	Controle	0,1 ^A \pm 0,3	0 ^A \pm 0
7	VC4	0,1 ^A \pm 0,3	0 ^A \pm 0
7	AC001	0,1 ^A \pm 0,3	0 ^A \pm 0
14	Controle	3,6 ^B \pm 0,9	0,5 ^B \pm 0,5
14	VC4	0,3 ^A \pm 0,4	0 ^A \pm 0
14	AC001	0,4 ^A \pm 0,5	0 ^A \pm 0
21	Controle	7,0 ^B \pm 2,4	1,1 ^B \pm 0,3
21	VC4	1,0 ^A \pm 0,8	0,2 ^A \pm 0,4
21	AC001	0,7 ^A \pm 0,4	0 ^A \pm 0

DPI: Dias após a infecção; AC001- *D. flagrans* e VC4- *P. clamydosporia*
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) no Teste de Tukey

5.2.2 Materiais Digeridos

Foram visualizadas larvas em todos os órgãos digeridos (fígado, pulmão, intestino e músculo). Dentre os materiais analisados o fígado digerido do controle foi o que obteve um maior número de larvas encontradas ao longo do experimento e em seguida o pulmão e o músculo (Tabela 4). Esses resultados corroboram com os dados encontrados em trabalhos realizados por Taira, Permin e Kapel (2003) que inocularam em galinhas 5.000, 10.000 e 20.000 ovos embrionados, que foram eutanasiados nos dias 1, 3 e 6 após a infecção. Na recuperação das larvas, 87% foram encontradas no fígado e no pulmão. Maruyama et al. (1994) ao inocular 1.500 ovos embrionados e analisar nos dias 3, 6, 10, 30 e 50, encontrou larvas em maior quantidade no fígado e no músculo.

Tabela 4: Contagem de larvas de *Toxocara canis* nos órgãos digeridos com ácidos HCL-Pepsina em galinhas inoculados com 5000 ovos embrionados

Dias PI	Grupos	Total de larvas				
			Fígado	Pulmão	Intestino	Músculo
3	Controle	76	38	22	16	0
3	VC4	43	38	3	2	0
3	AC001	14	6	4	4	0
7	Controle	89	50	19	5	15
7	VC4	26	12	11	2	1
7	AC001	15	8	6	1	0
14	Controle	213	160	29	2	22
14	VC4	11	8	1	2	11
14	AC001	45	24	10	0	11
21	Controle	389	269	60	0	60
21	VC4	39	26	6	1	6
21	AC001	24	17	3	1	3

DPI:Dias após a infecção; Grupos:AC001- *Duddingtonia flagrans*; VC4 - *Pochonia chlamydosporia*

Neste estudo, a quantidade de larvas de *T. canis* permaneceu em grande quantidade por um longo período no fígado da galinha, o que torna a ingestão de fígado cru ou mal cozido um dos riscos de infecção de larva migrans visceral (Taira, Permin, Kapel 2003; Morimatsu et al., 2006; Flecher 2010). Na análise do fígado digerido com 3 dias, houve diferença estatística $p < 0,01$ entre a média do número de larvas recuperadas no fungo AC001 ($0,6 \pm 2,3$) em relação ao controle ($3,8 \pm 2,3$). Não houve diferença estatística do fungo VC4 comparado com o controle. Podemos sugerir que este resultado foi devido ao tempo de interação insuficiente do fungo *P. Chlamydosporia* com os ovos embrionados, como demonstrado por Araujo et al. (2008) em que o potencial ovicida do fungo do gênero *Pochonia* spp atingiu o pico com 14 e 21 dias de interação com o ovos de *Ascaris suum in vitro*, momento em que se observou uma maior destruição por completo dos ovos de *A. suum*.

As médias e desvios padrão do fígado digerido nos grupos tratados e do controle obtiveram os seguintes resultados: com 7 dias pós infecção (PI) as médias dos tratados foram de $1,2 \pm 0,6$ (VC4), $0,8 \pm 0,4$ (AC001) e $5,0 \pm 0$ (controle); com 14 dias PI obtiveram nos grupos tratados $0,8 \pm 0,4$ (VC4), $2,4 \pm 0,8$

(AC001) e no controle $16,0 \pm 0$; E no dia 21 foi onde houve uma maior diferença entre as médias dos tratados ($2,6 \pm 1,5$ - VC4/ $1,7 \pm 0,9$ - AC001) em relação ao controle ($26,9 \pm 2,5$) (Tabela 5).

Quando confrontamos os dados encontrados no grupo tratado com o grupo controle, observamos que no fígado digerido houve diferença ($p < 0,01$) entre os dias 7, 14 e 21. Porém no dia 14 houve diferença estatística significativa entre as médias dos dois fungos AC001 ($12,4 \pm 0,8$) e VC4 ($0,8 \pm 0,4$), como demonstra a tabela 5.

Tabela5 : Média e desvio padrão (\pm) de larvas recuperadas em material digeridos com inoculação de 5.000 ovos de *Toxocara canis* tratado com *Duddingtonia flagrans*, *Pochonia chlamydosporia* e controle

Dias PI	Grupos	Média e desvio padrão			
		Fígado	Pulmão	Intestino	Músculo
3	Controle	$3,8^B \pm 2,3$	$2,2^B \pm 0,6$	$1,6^B \pm 1,2$	$0^A \pm 0$
3	VC4	$3,8^B \pm 2,3$	$0,3^A \pm 0,4$	$0,2^A \pm 0,4$	$0^A \pm 0$
3	AC001	$0,6^A \pm 2,3$	$0,4^A \pm 0,5$	$0,4^A \pm 0,5$	$0^A \pm 0$
7	Controle	$5,0^B \pm 0$	$1,9^c \pm 0,5$	$0,6^B \pm 0,5$	$3,0^B \pm 4,2$
7	VC4	$1,2^A \pm 0,6$	$1,1^B \pm 0,3$	$0,2^B \pm 0,4$	$0,1^A \pm 0,3$
7	AC001	$0,8^A \pm 0,4$	$0,6^A \pm 0,5$	$0,1^A \pm 0,3$	$0^A \pm 0$
14	Controle	$16,0^c \pm 0$	$2,9^c \pm 1,6$	$0,2^A \pm 0,4$	$2,1^A \pm 2,3$
14	VC4	$0,8^B \pm 0,4$	$0,1^B \pm 0,3$	$0^A \pm 0$	$0,2^B \pm 0,4$
14	AC001	$2,4^A \pm 0,8$	$1,0^A \pm 0$	$0^A \pm 0$	$1,1^A \pm 0,3$
21	Controle	$26,9^B \pm 2,5$	$6,0^B \pm 0$	$0^A \pm 0$	$0^A \pm 0$
21	VC4	$2,6^A \pm 1,5$	$0,6^A \pm 0,5$	$0,1^A \pm 0,3$	$0,1^A \pm 0,3$
21	AC001	$1,7^A \pm 0,9$	$0,3^A \pm 0,4$	$0,1^A \pm 0,3$	$0,1^A \pm 0,3$

DPI: Dias após a infecção; Grupos:

AC001- *Duddingtonia flagrans* e VC4 -*Pochonia chlamydosporia*

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente ($p < 0,01$) – Teste de Tukey

Houve diferença estatística entre as médias do pulmão digerido do tratado com o controle em todos os dias dos experimentos. No dia 7 PI a média de larvas contadas no grupo da *Pochonia* $1,1 \pm 0,3$ (VC4) foi maior do que no grupo da *Duddingtonia* $0,6 \pm 0,5$ (AC001), prevalecendo uma maior ação do grupo dos nematófagos da *Duddingtonia flagrans*, entretanto a média no dia 14

foi o oposto, no grupo da *Pochonia* $0,1\pm 0,3$ (VC4) obteve uma média de contagem inferior comparada com o grupo da *Duddingtonia* $1,0\pm 0$ (AC001).

O intestino digerido no dia 3 houve diferença estatística entre os tratados ($0,2\pm 0,4$ – VC4/ $0,4\pm 0,5$ – AC001) e controle ($1,6\pm 1,2$), já no dia 7, obteve uma diferença estatística somente na média do controle ($0,6\pm 0,5$) e do fungo *D. flagrans* ($0,1\pm 0,3$), prevalecendo à ação nematófaga do fungo *D. flagrans* comparada à ação ovicida do fungo *P. clamydosporia*.

As médias dos dias 14 (0 ± 0 /VC4; 0 ± 0 / AC001 e $0,2\pm 0,4$ / controle) e do dia 21 ($0,1\pm 0,3$ /VC4; $0,1\pm 0,3$ / AC001 e 0 ± 0 /controle) não tiveram diferenças estatísticas entre o tratado e controle, esse resultado pode ser devido à diminuição da migração das larvas nesse órgão após sete dias de infecção, esse valor coincide com o trabalho de Taira et al. (2003) que observou uma diminuição brusca de *T.canis* no intestino das galinhas após 3 dias de infecção. A diminuição das larvas no intestino ao longo do experimento é um resultado esperado, pois este órgão é um dos primeiros locais onde as larvas migram após a deglutição, por isso é de se esperar que no final do ensaio ocorra uma diminuição na contagem da larva neste órgão.

O músculo digerido demonstrou um resultado estatisticamente significativo entre os tratados e o controle no dia 7 ($0,1\pm 0,3$ /VC4; 0 ± 0 / AC001 e $3,0\pm 4,2$ / controle). No dia 14 houve diferença estatística entre o fungo *P. clamydosporia* ($0,2\pm 0,4$) e o controle ($2,1\pm 2,3$), essa ação predatória coincide com o trabalho de Araujo et al., (2010) onde foi relatado pela primeira vez a ação do fungo *P. clamydosporia* em ovos embrionados de *T. canis*, e foi observado a destruição por completo (efeito tipo 3) dos ovos de *T.canis* testado em condições laboratoriais. Já a média do dia 14 do fungo *D. flagrans* ($1,1\pm 0,3$) não houve resultado estatisticamente significativo quando comparado ao grupo controle. No dia três não houve diferença estatística entre os tratados e o grupo controle, devido à precocidade da data. Esse valor corrobora com resultado encontrado pelo autor Gargili et al., (1999), no qual não encontrou nenhuma larva no músculo da galinha até 10 dias após a infecção, no entanto o presente resultado difere do experimento de Taira et al. (2003) onde foi observado uma pequena quantidade de larvas de *T. canis* no músculo da galinha a partir de 3 dias após a infecção.

Os percentuais de redução dos órgãos digeridos nos grupos tratados em relação ao controle foram de 87,1 % (AC001) e 84,5% (VC4), sendo que o percentual de redução da *D. flagrans* foi maior que o do *P. clamydosporia*, prevalecendo uma atividade nematófagas sobre as larvas de *T. canis*. Esses percentuais de redução demonstram a ação dos fungos sobre larvas de terceiro estágio de *T. canis*, incapacitando assim as larvas de realizarem migração pelos tecidos.

As larvas de *T. canis* recuperadas nos órgãos de galinhas após os 3, 7, 14 e 21 dias de infecção, foram predominantemente encontradas no fígado, depois pulmão, músculo e intestino. Os dias com maior números de larvas foram os dias 14 e dia 21 (Tabela 5).

O acondicionamento em temperaturas ideais e o processamento correto nos órgãos, principalmente o fígado, diminui a chance de causar larva migrans visceral em humanos, como foi descrito por Noh et al. (2012) na Coréia do Sul, onde um rapaz de 17 anos contraiu meningite por *Toxocara canis* após ingerir um fígado cru de avestruz e Morimatsu et al. (2006) que também relatou a ocorrência de larvas migrans visceral em dois adultos da mesma família após comerem um fígado cru de galinha.

No presente trabalho foi observado motilidade nas larvas no fígado em diferentes temperaturas, foi observado motilidade larval no fígado resfriado a 4°C em todos os dias do experimento, isso demonstra o risco do potencial zoonótico da larva do *T. canis*, pois mesmo após dias de refrigeração em geladeira comercial foi observado atividade nas larvas. Nos materiais congelados a -20°C não foi observado presença de motilidade larval. Esse resultado coincide com as pesquisas dos autores Taira et al., (2012) onde comparou-se a diferença da motilidade larval de *Toxocara cati* no tecido de galinhas em diferentes temperaturas entre 4°C e -25°C, no qual a temperatura ideal para alocação desses materiais contaminados foi de -25°C por 24 ou 48 horas, uma vez que nessa temperatura não foi mais observada motilidade das larvas.

A atividade predatória dos fungos foi comprovada por meio do percentual de redução do número de larvas após o tratamento com o fungo. No experimento *in vitro* com *D. flagrans* obteve-se percentual de redução de 54,3%

e no experimento *in vivo* 87,1 % (AC001) e 84,5% (VC4) para *D. flagrans* e *P. clamydosporia* respectivamente.

Esse é o primeiro relato de uso de fungos *D. flagrans* e *P. clamydosporia* na predação de larvas e ovos de *Toxocara canis* inoculados em galinhas. Assim, através dos resultados encontrados no presente estudo corroboram com trabalhos anteriores sobre a eficiência de fungos nematófagos (*D. flagrans* e *P. clamydosporia*) no controle de larvas *Toxocara canis* em condições laboratoriais e confirmam a ação destes fungos em ensaio experimental.

6. Conclusão

- A diminuição da capacidade migratória da larva de *T. canis* foi observada em testes *in vitro* pelo percentual de redução com o fungo *D. flagrans* e em testes *in vivo* com *D. flagrans* e *P. clamydosporia*.
- A atividade da ação do fungo *D. flagrans* sobre larvas de segundo estágio no experimento *in vitro* foi observada nas contagens das médias dos grupos tratados e controle, nos quais os dias 2, 3, 4, 5 e 6 tiveram diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o controle.
- A atividade migratória das larvas foi observada em todos os órgãos digeridos no grupo controle, os órgãos com maior quantidade de larvas foram o fígado, pulmão e músculos. Houve uma diminuição na quantidade de larvas encontradas, conseqüentemente na migração delas pelos órgãos após o tratamento com os fungos (AC001 e VC4), demonstrado pelo percentual de redução, assim confirmando a atividade predatória dos fungos sobre larvas de terceiro estágio de *T. canis*.
- Por meio dos resultados demonstrados no presente trabalho, podemos indicar o uso destes fungos como uma alternativa do controle biológico, servindo, para complementar as medidas de prevenção e controle deste nematóide. No entanto, mais pesquisas são necessárias para ampliar o conhecimento sobre a interação dos fungos sobre larvas de *Toxocara canis*.

7. Referências Bibliográficas

Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO (2010) In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. Parasitol Res, 107(1):103-108

Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Ferreira SR, Tavela AO (2013) Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. Revista Brasileira de Parasitol Vet, 22:171-174

Araújo JV, Assis RCL, Campos AK, Mota MA (2004 b) Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. Revista Brasileira de Parasitol Vet, 13(2):65-71

Araújo JV, Braga FR, Milani JA, Silva AS, Tavela AO (2008) In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. Parasitol Res, 102:787-790

Araújo JV, Mota MA, Campos AK (2004 a) Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. Rev Bras Parasitol Vet, 13(0):165-169

Araújo JV, Santos MA, Ferraz S, Maia AS. (1993) Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys fungi* on infective *Haemonchus placei* larvae. J Helm 67:136-138

Ayres M, Ayres JRM, Ayres, DL, Santos AS. (2003) Aplicações Estatísticas Nas Áreas De Ciências Biológicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá: Brasília Cnpq. 290

Balogh J, Tunlid A, Rosén S (2003) Deletion Of A Lectin Gene Does Not Affect The Phenotype Of The Nematode-Trapping Fungus *Arthrobotrys Oligospora*. Fungal Genet Biol 39: 128–135

Barron GL (1977) The Nematode-Destroying Fungi. Topics In Mycobiology, No. 1. Canadian Biological Public, Guelph, Canada. 1:140.

Bowman DD (2006) Parasitologia Veterinária De Georgis. 8ª Ed, Manole, São Paulo

Braga FR (2008) Ação In Vitro De Fungos Das Espécies *Duddingtonia Flagrans*, *Monacrosporium Sinense* E *Pochonia Clamidosporia* Sobre Os Ovos De *Fasciola Hepática* E *Schistosoma Mansoni*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal De Viçosa

Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Kanadani AC (2009a) Biological control of horse cyathostomin (*Nematoda* : *Cyathostominae*) with the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeast Brazil Vet Parasitol. 163:4:335-340

Braga FR, Araujo JV, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, Ferreira SR, Carvalho GR. (2010a) Viability of the nematophagous fungus *Pochonia Clamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. Vete Parasitol 168:264-268

Braga FR, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Araújo JV, Frassy, LN (2010b) Atividade Predatória Dos Fungos Nematófagos *Duddingtonia Flagrans*, *Monacrosporium Thaumasiium* E *Artrobotrys Robusta* Sobre Larvas Infectantes De *Strongyloides Stercoralis*. Rev Soc Bras Med Trop 43:588-590

Braga FR, Araujo J M, Silva AR, Araújo JV, Carvalho RO, Soares FEF, Queiroz JH, Gênier LA. (2011a) Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (1):44

Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Frassy LN, Tavela AO, Soares FEF, Carvalho RO, Queiroz LM, Queiroz JH(2012) *Pochonia Chlamydosporia* Fungal Activity In A Solid Medium And Its Crude Extract Against Eggs Of *Ascaridia Galli*. J Helm, 86:348-352.

Braga FR, Araujo JM, Araújo JV, Soares FEF, Tavela AO, Frassy LN, Lima WS, Mozzer LR (2013) In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. Rev. Soc. Bras. Med. Trop 46:108-110

Braga FR, Silva AR, Araujo JM, Ferreira SR, Araújo JV, Frassy LN. (2009b) Ação Ovicida Do Fungo *Pochonia Chlamydosporia* Sobre Ovos De *Enterobius Vermicularis*. Revista Do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 68:152-155

Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JV, Pinto PSA. (2011b) Ovicidal activity of diferente concentration of *Pochonia Clamydosporia* on *Taenia taeniaformis* eggs. J. Helminthol, 85:7-11

Bowman DD (2010) Parasitologia Veterinaria, 9ª edição, Elsevier; Rio de Janeiro

Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Alves CDF (2010) Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces Ilacinus* on *Toxocara canis* eggs. Vete Parasitol, 169:123-127

Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. (2009) Predatory activity of Nematophagous fungi on *Ancylostoma* ssp. infective larvae: evaluation in vitro and after passing through gastrointestinal tract of dogs. J Helmin, 83:231-239

Carvalho RO, Braga FR, Araújo JV. (2011) Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs. Vete Parasitol (Print), 176:236-239

Carvalho RO (2004) Eficácia do Fembendazol e do Pamoato de Pirantel sobre *Ancylostoma* sp e *Toxocara canis*. Universidade Federal de Viçosa (Magister Scientiae), Viçosa, Minas Gerais

Drechsler C.(1937) Some hyphomyctes that prey on free-living terricolous nematodes. mycologia, .29:447-552

Fantoni DT, Cortopassi SRG, Bernardi MM. (1999) Anestésicos Intravenosos E Outros Parenterais. In: SPINOSA, E.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. Farmacologia Aplicada À Medicina Veterinária. 2ª Ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan pp.114-124

Flecher MC (2010) Infecção De Gerbils (*Meriones Unguiculatus*) com *Toxocara canis*: migração de larva e estudo morfológico com pesquisa imunohistoquímica de antígenos de larvas nas lesões. Dissertação (Mestrado Em Doença Infecciosa) Universidade Federal Do Espírito Santo, Espírito Santo

Frassy LN, Braga FR, Silva AR, Araújo JV, Ferreira SR, Freitas LG (2010) Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Rev Soc Bras Med Trop (Impresso), 43:102-104

Galvin TJ. (1964) Experimental *Toxocara canis* infections in chickens and pigeons. J. Parasitol 50:124-127

Gardili A, Truzer E, Gulamber A, Toparlak M, Efil I, Keles V, Ulutas M.(1999) Experimental visceral larva migrans in chicken with *Toxocara canis*. Turk Vet Ve Hayvanc Derg 23:431-433

Graminha EBN.(2004) Isolamento e atividade predatória de fungos nematófagos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP. UNESP Tese (Doutorado Em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal: São Paulo

Gray NF. (1988) Fungi Attackhing Vermiform Nematodes. In: Poinar, O.G.; Borne, J.H. (Eds). Diseases Of Nematodes. Boca Raton: CRC Press, pp 3-38

Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J(1996) Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. Vet Parasitol, 64(1-2):47-64

Hallack KA, Cunha RMC (2009) Larva Migrans Visceralis. In: Focaccia, Tratado De Infectologia. 4ª Ed. Atheneu: São Paulo, pp.1953-1957

Kopp SR, Coleman GT, Mccarthy JS, Kotze AC. (2008) Application of in vitro anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. *Vet Parasitol*, 152:284–293

Lima MS (2007) Larva *Migrans* Visceral. In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A. *Parasitologia Humana*. 11^a Ed. Atheneu: São Paulo

Lysek H.(1976) Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta Univ Palack Olom*. 76 (1):9-13

Lysek H, Sterba J. (1991) Colonization Of *Ascaris Lumbricoides* Eggs By The Fungus *Verticillium Chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol*, 38:255-259

Maciel AS, Araujo JV, Cecon PR. (2006) Atividade predatória in vitro dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma spp* em cães. *Rev. Bras. Parasitol*. 15(2):71-75.

Maruyama S, Nino T, Yamamoto K, Katsube Y (1994) Parasitism Of *Toxocara Canis* Larvae In Chickens Inoculated With The Ascarid Eggs. *J Vet Med Sci* 56(1):139–141

Mello INK, Braga FR, Monteiro TSA, Freitas LG, Araújo JM, Soares FEF, Araújo JV (2014) Biological control of infective larvae of *Ancylostoma spp.* in beach sand. *Rev Iberoam Micolog*, 31(2):114-118

Monteiro, SG.(2010) *Parasitologia Na Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, pp.356

Moreira-Silva SF, Leão ME, Mendonça HF, Pereira FE(1998) prevalence of anti-*toxocara* antibodies in a random sample of inpatients at a children's hospital in Vitória, Espírito Santo, Brazil. *J Instit Trop Med São Paulo*, 40(4):259-261

Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y, Aizawa H. (2006) Case reports: a familial case of visceral larva *migrans* after ingestion of

raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Americ J Trop Med Hyg*, 75(2):303-306

Nansen P, Foldager J, Hansen JW, Henriksen SA, Jorgesen RJ (1988) Grazing and acquisition of *Ostertagia Ostertagi* in calves. *Int. J. Parasitol*, 27:325-335

National Center For Biotechnology Information. Disponível Em: <[Http://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Taxonomy/Browser/Wwwtax.Cgi?Id=6265](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?Id=6265)>. Acesso em: 11 Ago 2014

Noh Y, Hong St, Yun Jy, Park Hk, Oh Jh, Kim Ye, Jeon Bs.(2012) Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. *J Kor Med Sci*, 27:1105-1108

Núñez CR, Martínez GDM, Arteaga SY, Macotela MP, Montes PB, Durán NR(2013) Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *Scientificworld J*, 4

Rey L.(2011) Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. Ed. Guanabara Koogan: Rio De Janeiro

Ribeiro RR (2003) atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. Viçosa: UFV. Dissertação (Mestrado Em Medicina Veterinária) – Universidade Federal De Viçosa, Minas Gerais

Robertson ID, Thompson RC (2002) Enteric parasitic zoonoses of domesticated dog and cats. *Microb Infec* 4:867-873

Rosén S, EK B, Rask L, Tunlid A.(1991) Purification And characterization of a surfasse lectin from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys Oligospora*. *J Gen Microbiol*, 138:2663-2672

Sanyal PK, Chauhan JB, Mukhopadhyaya. (2004) implications of fungicidal effects Benzimidazole compounds of *Duddingtonia flagrans* In

integrated nematode parasite management in livestock. *Vet Res Com*, 28(4):375-385

Soares FEF, Queiróz JH, Braga FR, Tavela AO, Araújo JM, Fonseca LA, Gouveia AS, Araújo JV. (2014) Action of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Diectophyma renale* eggs *Bio Sci Technol*, 24(4):399-406

Taira K, Permin A, Kapel CM (2003) Establishment and migration pattern of *Toxocara canis* larvae in chickens. *Parasitol Res*, 90:521-523

Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CM (2004) Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol*, 121(1/2):115-124

Taira K, Saitoh Y, Kapel CM. (2011) *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. *Vet Parasitol*, 180:287-291

Taira K, Saitoh Y, Okada N, Sugiyama H (2012) Tolerance to low temperature of *Toxocara cati* in chickens muscle tissue. *Vet Parasitol* 1-4

Taylor MA, Coop RL, Wall RL (2010) *Parasitologia Veterinária*. 3^a Ed. Guanabara Koogan: Rio De Janeiro

Terril TH, Larsen M, Samples O, Hsted S, Miller JE, Kaplan RM, Gelaye S (2004) Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern united states: dose titration and dose time interval studies. *Vet Parasitol*, 120:285-296

Wang RB, Yang JK, Lin C, Zhang Y, Zhang KQ (2006) Purification and characterization of an extracelular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella Shizishanna*. *Let App Microbiol*, 42:589-594

Yang J. Huang X, Tian B, Wang M, Niu Q, Zhang K (2005) Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. Biotechnol Let ,27:1123-1128