

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**ALESSANDRA GONÇALVES DE PÁDUA**

**CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS  
(*MUS MUSCULUS*) C57BL/6 E B10.A À INFECÇÃO POR *Lagochilascaris minor*  
E SUA ATUAÇÃO COMO HOSPEDEIRO DEFINITIVO NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL.**

**Orientadora: Profa. Dra. MARA SILVIA CARVALHAES**

**Co-orientadora: Profa. Dra. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Goiânia-GO, 2006**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ALESSANDRA GONÇALVES DE PÁDUA

CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS  
(*MUS MUSCULUS*) C57BL/6 E B10.A À INFECÇÃO POR *Lagochilascaris minor*  
E SUA ATUAÇÃO COMO HOSPEDEIRO DEFINITIVO NA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL.

**Orientadora:**

Profa. Dra. MARA SILVA CARVALHAES

**Co-orientadora:**

Profa. Dra. ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS

Dissertação submetida ao  
CPGMT/IPTSP/UFG como requisito parcial  
para obtenção do Grau de Mestre em  
Medicina Tropical na área de concentração  
em Parasitologia.

Goiânia – GO, 2006

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(GPT/BC/UFG)

Pádua, Alessandra Gonçalves de  
**P125c** **Caracterização da susceptibilidade de  
camundongos  
isogênicos (*Mus musculus*) C57BL/6 e B10.A A  
infecção  
por *Lagochilascaris minor* e sua atuação como  
hospedeiro  
definitivo na infecção experimental. / Alessandra  
Gonçalves de Pádua. - Goiânia, 2006.**

52 f. : il.

Orientadora: Mara Silvia Carvalhaes.

Co-orientadora: Ana Paula Junqueira Kipnis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de  
Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,  
2006.

Bibliografia : f. 9-14, 48-52

1. Helmintíase 2. Helmintíase - Resistência 3. Helmin-  
tíase - Susceptibilidade 4. Camundongo como animal de  
laboratório 5. *Lagochilascaris minor* I. Carvalhaes, Mara  
Silvia. II. Kipnis, Ana Paula Junqueira III. Universidade  
Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde  
Pública IV. Título.

CDU: 616.995.1

*Sem sonhos, a vida não tem brilho.*

*Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenha medo dos tropeços da jornada. Não se esqueça de que você, ainda que incompleto, foi o maior aventureiro da História.*

*Augusto Cury.*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus amados pais, que além de me permitirem a vida, sempre estiveram ao meu lado, nunca em momento algum me desampararam. Nos momentos de lágrimas era em vocês que eu buscava o consolo e vocês sempre me acolheram e me aconselharam com muita sabedoria! Nos momentos de alegria, vocês também estavam ali juntos comigo. Vocês são para mim exemplos de caráter e coragem. Vocês sim são os verdadeiros Mestres, pois graças à educação e a formação que me deram, consegui estudar e alcançar os meus objetivos. Com vocês aprendi que devemos ser sinceros com o próximo, sendo assim, conheci pessoas maravilhosas na minha vida as quais consegui conquistar e hoje posso chamá-los de amigos! Terminamos mais essa etapa de nossas vidas juntos, quero que saibam que nada seria possível sem vocês. Obrigada por serem maravilhosos e presentes em minha vida, amo vocês!*

*Aos meus queridos irmãos Alessandro e Roberta, obrigada pelo carinho, amizade e ajuda, que Deus continue sempre fazendo com que o amor que existe entre nós nunca se acabe, pelo contrário, aumente a cada dia, e que possamos sempre contar uns com os outros. Amo muito vocês dois! Alessandro, obrigada pela compreensão e paciência sempre! Roberta e Wanderlei, além do carinho sempre prestado, obrigada pelo nascimento do nosso maior tesouro, João Guilherme. João você chegou na vida da tia para trazer muita alegria e serenidade, te amo muito meu anjo.*

*Ao meu amor Rogério, companheiro, amigo e incentivador, sempre ao meu lado ajudando nas horas difíceis da minha vida. Saiba que neste trabalho tem muito de você, pois você é um exemplo de garra, caráter e perseverança, toda minha admiração e carinho por você. Te amo muito!*

*Ao meu querido amigo Drº. Élbio, que tem me ensinado muito a cada dia. O primeiro passo para iniciar este trabalho foi dado pelo senhor, que me chamou e disse filha, sem estudo tudo se torna mais difícil, agora é hora de estudar! Lembra? As dificuldades vieram, mas o senhor como um grande amigo e um excelente educador, me orientou com sua inquestionável sabedoria sobre o que fazer. Hoje o nosso trabalho ficou pronto graças também a sua colaboração. Eu só tenho a lhe agradecer, por ter sempre acreditado na minha capacidade, que bom saber que posso contar com uma pessoa como o senhor na minha caminhada!*

*A minha co-orientadora Drª Ana Paula Kipinis, como educadora um exemplo de amor e dedicação, como pessoa, amiga e companheira. Conheci você há pouco tempo, mas o seu respeito por mim e seu empenho em me ajudar a neste trabalho, me fez ter a certeza de que você é uma pessoa especial. Eu a vejo como uma pessoa que ama a vida e as possibilidades que Deus lhe tem concedido, por ser assim você se torna contagiante, com uma maneira admirável de ensinar que nos faz ter sede de conhecimento e vontade de lutar. Professora, obrigada por tudo e saiba que você apareceu em um momento muito importante para mim. Que Deus lhe abençoe sempre nessa sua jornada!*

## *AGRADECIMENTOS*

*A Deus pela vida, saúde, sabedoria e felicidade.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mara Carvalhaes, pela disponibilidade e orientação no trabalho.*

*Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> André Kipnis, pela carinho e dedicação nas correções do trabalho.*

*Às amigas Mariana, Jaqueline e Joyce, pela ajuda prestada, pelos momentos de cumplicidade e amizade. Sempre me lembrarei de vocês com muito carinho.*

*Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Ruy Lino de Souza Júnior, pela amizade prestada e colaboração no desenvolvimento do trabalho.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Dorta pelo carinho e cuidado nas correções.*

*Aos Prof<sup>os</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dulcinéia Maria Barbosa, Julieta Paç e Alverne, pela amizade e disponibilidade.*

*Aos Prof<sup>os</sup>. José Luís e Andréa, pela disponibilidade na coloração das lâminas.*

*Aos Prof<sup>os</sup>. Mirian Dorta, Ruy Lino e Luiz Roberto por aceitarem participar da banca de qualificação.*

*Ao meu primo e amigo Weuber pelo carinho e ajuda sempre.*

*Ao setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge: Dr<sup>a</sup> Glória Jabor e Rita de Cássia pelo amor e longas horas de conversas e conselhos. Dr<sup>a</sup>, Dr<sup>o</sup> João Alves, Dr<sup>a</sup> Eliane Mota, Dr<sup>o</sup> Ailton Fraga, pelo incentivo, compreensão e amizade. Elisângela, Thelma, Marilene e Jhony, pelo carinho, amizade e ajuda. Aos amigos, Eterno, Vitorio, Eliane e Júnior, pelo carinho, amizade e*

*disponibilidade na confecção dos histopatológicos. Joaquim, Elaine, Conceição, Joelma, Neonézia, Gustavo, Karla, Daniel, Rosane e Benedito, pelo incentivo e amizade.*

*Aos amigos Michelle, Cristina, Arioldo, Ludimila, Rafael, Robson e Viviane. Meu profundo agradecimento pela acolhida, amizade, incentivo e carinho de vocês.*

*Aos amigos Zezinho e Karine pela ajuda sempre carinhosa. À dona Maria de Jesus pela amizade e colaboração.*

*À coordenação do Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical na pessoa da coordenadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Regina Maria Bringel e demais professores.*

## SUMÁRIO

Conteúdo	Página
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivo Geral.....	7
3. Objetivos Específicos.....	7
4. Referências Bibliográficas.....	8
5. Artigo Científico.....	12
Título, Autores, Descritores.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	18
A. Parasitos.....	18
B. Inóculo.....	18
C. Animais e vias de inoculação.....	18
D. Quantificação dos nódulos, mensuração das larvas, identificação das formas jovens/adultas do parasito.....	19
E. Histopatologia.....	19
F. Sobrevida após infecção com <i>Lagochilascaris minor</i> .....	20
G. Análise estatística.....	20

<b>Resultados.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Parâmetros Parasitológicos.....</b>	<b>21</b>
<b>A. Contagem de nódulos.....</b>	<b>21</b>
<b>B. Mensuração das larvas de <i>L. minor</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>C. Parasitos jovens e adultos em camundongo C57BL/6 e B10.A....</b>	<b>26</b>
<b>2. Padrão histopatológico das lesões.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Sobrevida dos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Lagochilascaris. Minor</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Sobrevida dos camundongos B10A infectados com <i>Lagochilascaris minor</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>5. Sobrevida comparada dos camundongos C57BL/6 e B10A infectados com <i>Lagochilascaris minor</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>47</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>48</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A lagochilascariase é uma doença de evolução longa, caracterizada pela presença de nódulos aparentemente cicatrizados e aparecimento de novos nódulos, em locais próximos aos iniciais, na maioria das vezes com drenagem de material purulento e parasito, causando sérios problemas sociais (Semerene *et al.* 2004). A localização das lesões direciona a gravidade da doença, sendo relatados desde casos fatais até casos em que as lesões pouco influem no estado geral do paciente (Semerene *et al.* 2004). A letalidade tem sido observada em pacientes com comprometimento pulmonar (Moraes *et al.* 1985) ou do sistema nervoso central (Rosemberg *et al.* 1986, Veloso *et al.* 1992). Isto se deve a falta de diagnóstico parasitológico adequado e da utilização de terapêutica específica (Botero *et al.* 1984). O diagnóstico é realizado pelo exame parasitológico, mas a helmintíase deve ser diferenciada pelo clínico de outras infecções tais como: tuberculose, paracoccidioomicose, leishmaniose e actinomicose.

Os relatos anatomopatológicos na infecção humana por *Lagochilascaris minor* demonstram o desenvolvimento de nódulos subcutâneos, pseudocistos, ou abscessos, que muitas vezes eliminam parasitos junto com a secreção. Nestas secreções encontram-se todos os estágios evolutivos do parasito indicando a ocorrência de auto-infecção (Moraes 1983). A análise microscópica destas lesões demonstrou a presença de áreas edemaciadas, difusamente infiltradas por células mononucleares, as quais circundam granulomas e microabscessos (Veloso *et al.* 1992).

São conhecidas cinco espécies do gênero *Lagochilascaris*, a primeira descrita por Stossich em 1902 como *Lagochilascaris turgida* encontrada em *Didelphis crassicauda*, uma espécie de gambá. Leiper em 1910 descreveu *Lagochilascaris major* como espécie encontrada no leão africano (*Felis leo*). Em 1971, Sprent encontrou *Lagochilascaris buckley* parasitando *Felis concolor* (gato selvagem). Bowman *et al.* (1983) descreveram por fim *Lagochilascaris sprenti*, como parasito de marsupiais. *Lagochilascaris minor* foi descrito pela primeira vez por Leiper em 1909, a partir de espécimes coletadas de abscessos subcutâneos de dois pacientes de

Trinidad. Posteriormente o parasito foi referido em outros casos humanos, de Trinidad, Costa Rica, Venezuela, Suriname e Brasil, quase sempre associado a lesões da região cervical, ou de ouvido médio e mastóide (Paçô *et al.* 1998). Do ponto de vista médico-sanitário, *L. minor* é a espécie mais importante, pois tem sido encontrada infectando o homem, sendo este considerado um hospedeiro acidental. No entanto o hospedeiro natural de *L. minor* não é conhecido até hoje (Smith *et al.* 1983, Baracat *et al.* 1984, Moraes *et al.* 1985, Campos *et al.* 1987, e Volcan *et al.* 1992). Apesar de *L. major* ser morfológicamente semelhante a *L. minor*, acredita-se que não esteja associado à doença humana. Segundo Amato *et al.* (1990) *L. major* foi encontrado em gatos domésticos no Brasil, que apresentaram lesões cervicais comparáveis à do homem causadas por *L. minor*.

A doença humana tem distribuição geográfica restrita a países das Américas como México, Costa Rica, Trinidad Tobago, Colômbia, Venezuela, Suriname, Brasil e mais recentemente Bolívia (Paçô *et al.* 1998). A lagochilascaríase passou a ser considerada uma helmintíase emergente em razão do crescimento da casuística humana, onde o Brasil lidera com aproximadamente 50% dos 90 casos registrados até 1995. A Amazônia brasileira, principalmente o vale entre os rios Araguaia e Tocantins, constitui a região onde ocorre uma maior concentração de casos, sugerindo que o parasito encontre ali, condições ideais para seu desenvolvimento (Paçô *et al.* 1998).

Sprent (1971) considera o gênero *Lagochilascaris* pertencente à família Ascaridoidea, por entender que esses parasitos têm grande semelhança morfológica com ascaridoideos de répteis do gênero *Ophidascaris* e afirma que os parasitos deste gênero são naturais da primeira porção do aparelho digestivo de algumas serpentes, e não da luz intestinal do hospedeiro. Ainda segundo Sprent (1971) o achado de parasitos adultos de *Lagochilascaris* na luz intestinal se deve à ingestão de parasitos presentes nos tecidos de uma presa qualquer por ele devorada.

O gênero *Lagochilascaris* é constituído de pequenos nematódeos desprovidos de asas cervicais, cuja boca é guarnecida por três lábios, e que apresentam um estrangulamento transversal na cutícula e um esôfago claviforme que se comunica com o intestino sem transição. As fêmeas medem de 15 a 20 mm, em média, e

apresentam o útero com algumas alças anteriores à vulva, vagina dirigida inicialmente de trás para diante, e ovários posteriores. Os machos medem de 10 a 12 mm, têm a extremidade posterior levemente recurvada para a face ventral, aí exibindo duas espículas subterminais, retráteis. As formas jovens, ou imaturas medem 10 mm aproximadamente, e não têm estruturas sexuais visíveis. Os ovos são sub-esféricos de casca espessa como os de *Ascaris sp.*, e com a superfície marcada por múltiplas escavações que lhes conferem um perfil de tampa de garrafa de refrigerante, portanto não mamelonadas como nos de *Ascaris* (Leão *et al.* 1978).

Os hospedeiros naturais de *L. minor* sejam eles definitivos ou paratênicos, ainda não são conhecidos. No entanto, ao longo dos anos a caracterização destes hospedeiros tem sido objeto de intensa discussão. Leiper, em 1909, sugeriu que o homem deveria ser um hospedeiro acidental deste helminto, cujo “habitat” normal seria o trato alimentar de um outro animal, provavelmente um carnívoro silvestre. Corroborando esta idéia, Winckell & Treurniet, em 1956, acreditavam que no trato alimentar de onças e outros felídeos selvagens poderiam ser encontrados *L. minor*. Bruijning (1957) ao contrário, argumentou que nenhum relato anterior a 1957 indicou outro hospedeiro que não o homem, e que os exemplares de *L. minor* referidos como provenientes do intestino de felinos, procediam, na verdade, de um abscesso mastoidiano do homem. Alguns autores relatam que o parasito já foi encontrado no intestino de *Felis nebulosa* da América do Sul (Artigas *et al.* 1968, Oostburg & Varma 1968). Vidotto *et al.* (1982) relatam que o cão doméstico foi encontrado naturalmente infectado por *L. minor*, com lesões de localização esofágica e mediastínica, mas com parasitos de tamanho inferior aos encontrados no homem, e com pequenas quantidades de ovos no interior das alças uterinas. Esses autores sugerem que o cão talvez seja um hospedeiro menos adaptado a essa infecção que o homem, uma vez que parasitos adultos e ovos são facilmente encontrados nas lesões humanas.

Os mecanismos de infecção ainda não foram bem esclarecidos talvez pelo fato do parasito possuir hábitos bem inusitados, existindo algumas hipóteses e propostas de ciclos experimentais tais como: transmissão mecânica por meio de tabanídeos (mutucas) (Artigas *et al.* 1968), transmissão por infecção subcutânea de camundongos suíços, com material de abscesso; transmissão por escarificação

cutânea com material purulento de lesões em cobaios, mas todos sem sucesso (Oosterburg & Varma 1968). Em 1971, Sprent sugeriu que o ciclo evolutivo de *L. minor* fosse semelhante ao ciclo de *Ascaris lumbricoides* desde ingestão do ovo até a chegada de larvas de 2º estágio aos pulmões, onde ocorreria a segunda muda. As larvas de 3º estágio, dos pulmões chegariam à traquéia e, ao invés de serem deglutidas, como no ciclo do *A. lumbricoides*, se estabeleceriam nas criptas das tonsilas, seios nasais e tecidos relacionados. Além destas hipóteses existem algumas mais ousadas como a de Fraiha *et al.* (1983) que acreditam que a via hídrica seja a mais importante para infecção através de larvas infectantes possivelmente de 2º estágio, provenientes de felídeos silvestres. Smith *et al.* (1983) sugeriram que o ciclo de *L. minor* deveria envolver um hospedeiro que não o homem, nos estágios precoces do desenvolvimento e que a infecção resultaria da ingestão de carne crua ou mal cozida de um mamífero contaminado. As larvas poderiam migrar do estômago para os tecidos que comunicam com a faringe, onde os parasitos adultos têm sido encontrados no homem como tonsilas, seios nasais, seios maxilares, ouvido médio e processo mastóide. Acredita-se que algum animal silvestre ou doméstico sirva como hospedeiro definitivo de *L. minor*, porque a infecção humana parece ser rara para desempenhar um papel na manutenção deste helminto na natureza.

O fenômeno de auto-infecção tem sido registrado em animais e no homem e a origem do ciclo auto-infectante pode ser decorrente da reprodução do parasito adulto no local das lesões (Campos *et al.* 1985, Moraes *et al.* 1985, Campos *et al.* 1987 e 1992, Monteiro *et al.* 1988, Fraiha *et al.* 1989, Volcan *et al.* 1992). A presença de parasitos adultos na musculatura esquelética da região cervical e nódulos de camundongos tem sido descritos na literatura (Smith *et al.* 1983, Campos *et al.* 1992).

Campos *et al.* (1992) e Volcan *et al.* (1992) desenvolveram um ciclo evolutivo experimental de *L. minor*, fundamentado na publicação de Smith *et al.* (1983) sobre o ciclo de *L. sprenti*, na qual esses autores demonstraram a obrigatoriedade de um hospedeiro intermediário no desenvolvimento do referido parasito. Nesta ocasião, Campos *et al.* (1992) demonstram que camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*)

atuam como hospedeiros intermediários, enquanto gatos (*Felis domestica*) e cães (*Canis familiares*) atuam como hospedeiros definitivos. Confirmando esta hipótese foi demonstrado que além do camundongo, *Dasyprocta agouti* (cutia) e *Cavia porcellus* (preá) respondem à infecção por *L. minor* de maneira análoga aos camundongos, hospedeiros intermediários no ciclo evolutivo experimental (Paçô *et al.* 1992).

Após descrição do ciclo experimental, os camundongos têm sido avaliados quanto a sua resistência à infecção com *L. minor*. Em camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 a infecção por *L. minor* induz uma reação granulomatosa desorganizada nos pulmões, constituída por células gigantes de corpo estranho a partir dos 13 dias pós-infecção, com presença marcante de eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório perivascular, evoluindo para encistamento com fibrose concêntrica aos 61 dias pós-infecção (Semerene *et al.* 2004). Freitas *et al.* (2003) descreveram que camundongos B10.A infectados com *L. minor* apresentaram aos 60 dias pós-infecção nódulos encistados na musculatura esquelética contendo larvas do parasito circundadas por intenso infiltrado inflamatório contendo alguns polimorfonucleares, e principalmente macrófagos xantomatosos. Camundongos A/J quando comparados ao B10.A nas mesmas condições de infecção e no mesmo período, apresentaram nódulos na musculatura esquelética circundados por discreto infiltrado inflamatório contendo poucos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. O número de nódulos, ou seja, de larvas encistadas no tecido muscular superficial e subcutâneo foi determinado em camundongos B10.A e A/J, onde camundongos B10.A apresentaram o maior número de nódulos aos 180 dias pós-infecção e A/J aos 120 dias, mas apesar de apresentarem o número máximo de nódulos em diferentes dias, com diferença pouco significativa na quantidade de nódulos apresentados por ambos. A avaliação da sobrevida cumulativa sugere que os camundongos da linhagem A/J sejam mais resistentes (sobrevida: 95%) à infecção por *L. minor* que os camundongos B10.A (sobrevida: 40%) (Pádua *et al.* 2003).

O entendimento da resistência dos camundongos à infecção por *L. minor* ajudaria a compreender os mecanismos envolvidos no controle do parasito assim como no prognóstico e tratamento da infecção. Com este intuito, decidimos verificar

se os genes associados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) estariam envolvidos na resistência a esta infecção.

Diante do exposto, neste trabalho comparamos durante 360 dias de infecção com *L. minor*, duas linhagens de camundongos congênicos (B10.A e C57BL/6) que diferem apenas nos alelos das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) de classe II.

## 2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a infecção experimental de camundongos isogênicos congênicos C57BL/6 e B10.A com *Lagochilascaris minor*.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Comparar a quantidade os nódulos encistados no tecido subcutâneo muscular superficial de camundongos C57BL/6 e B10.A;
- B) Mensurar larvas retiradas dos nódulos e avaliar morfológicamente a presença de parasitos adultos;
- C) Comparar as alterações morfológicas e histopatológicas do fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 e B10.A;
- D) Comparar a sobrevivência dos camundongos C57BL/6 e B10.A infectados com *L. minor*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amato JFR, Grisi L, Pimentel Neto M. Two cases of fistulated abscesses caused by *Lagochilascaris major* in the domestic cat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 85:4:47-3,1990.

Artigas PT, Araújo P, Romiti N, Ruivo M. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 10:78-83, 1968.

Baracat DA, Freire EL, Aquino JL. Oto-mastóidite crônica por *Lagochilascaris minor* com comprometimento da região temporo-parieto-occipital. *Rev Universidade Federal do Mato Gross*. 2:9-14, 1984.

Botero D, Little MD. Two cases of human *Lagochilascaris* infection in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 33:381-386, 1984.

Bowman DD, Smith JL, Little MD. *Lagochilascaris sprenti* sp. n. (Nematoda: Ascarididae) from opossum, *Didelphis virginiana* (Marsupialia: Didelphidae). *J Parasit*. 69:754-760, 1983.

Bruijning CFA. Note on *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Docum Med Geogr Trop*. 9:173-175, 1957.

Campos DMB, Komma MD, Barbosa W, Santos MAQ, Pinto RNL, Barcelos M, Carneiro JR, Evangelista A. Notas parasitológicas sobre lagochilascariase humana em Goiás. *Rev Pat Trop*. 16:129-134, 1987.

Campos DMB, Santos MAQ, Souza LCS, Rosa ZS, Nalbadian HA. Novos casos de infecção por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, procedentes das microrregiões: Araguaia Paraense, Extremo Norte Goiano, Baixo Araguaia Goiano. IN: *Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia*, 10. Resumos. P.95, 1987.

Campos DMB, Freire-Filha LG, Vieira MA, Paçô JM, Maia MA. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Med Trop.* 34:277-287, 1992.

Campos R, Vieira-Bresson MCR, Little MD, Rosemberg S, Pereira VC, Masuda Z. Encefalopatia aguda causada por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. II Aspectos parasitológicos. In: *Congresso da sociedade Brasileira de Medicina. Tropical*, 21. Resumos. p. 74, 1985.

Fraiha H, Rocha MPC, Araújo OJ, Barros VLRS, Primo A, Moraes MAP, Conceição JR, Oliveira JE. Patologia amazônica exótica. II: Infecção humana por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, (Nematoda, Ascarididae). Registro de três novos casos, e formulação de nova hipótese para o mecanismo de infecção. In: *Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 8., e Congresso da Federacion Latino Americana de Parasitologia*, 6. Resumos. p. 146, 1983.

Fraiha H, Leão RNQ, Costa FSA. Lagochilascariase humana e dos animais domésticos. *Zoon Rev Inst.* 1:25-33,1989.

Freitas JGA, Pádua AG, Prudente MF, Jesus MC, Eunice B, Campos AP, Campos DMB, Paula EC, Carvalhaes MS. Lagochilascariase experimental em camundongos B10.A e A/J. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36, Suplemento I 169, 2003.

Leão RNQ, Leão Filho J, Dias LB, Calheiros LB. Infecção humana pelo *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Registro de um caso observado no Estado do Pará (Brasil). *Rev Inst Med Trop.* 20:300-306, 1978.

Leiper RT. A new nematoda worm from Trinidad: *Lagochilascaris minor*. *Proc Zool Soc London.* 4:742-743, 1909.

Monteiro MR, Albuquerque HPC, Souza JM, Abdon NP, Frahia Neto H, Souza JR, Almeida AJL. Comprometimento do sacro na lagochilascariase. *In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24. Resumos, p. 98, 1988.

Moraes MAP, Arnaud MVC, Lima PE. Novos casos de infecção humana por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, encontrados no Estado do Pará, Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 25:139-146, 1983.

Moraes MAP, Arnaud MVC, Macedo RC, Anglada AE. Infecção pulmonar fatal por *Lagochilascaris sp*, provavelmente *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Med Trop*. 27:46-52,1985.

Oostburg BFJ & Varma AAO. *Lagochilascaris minor* infection in Surinam. Report of a case. *Amer J Trop Med Hyg*. 17:548-550, 1968.

Pádua AG, Freitas JG, Prudente MF, Paula EC, Carvalhaes MS. Suscetibilidade a lagochilascariase experimental é independente dos genes do CHP. *Revista de Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia* 235, 2003.

Paçô JM, Campos DMB, Barbosa CAL. Importância do hospedeiro intermediário no ciclo e volutivo experimental de *Lagochilascaris minor*. *In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28. Resumos p.100, 1992.

Paçô JM, Campos DMB. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909: nove décadas de revisão bibliográfica. *Rev Pat Trop*, 27:11-34, 1998.

Rosemberg S, Lopes MBS, Masuda Z, Campos R, Bressan MCS. Fatal encephalopathy due to *Lagochilascaris minor* infection. *Amer J Trop Med Hyg*. 35:575-578,1986.

Semerene AR, Júnior RSL, O JA, Albino VM, Mariane MAS, Barbosa AP, Campos DMB. Experimental Lagochilascariosis: Histopathological Study of Inflammatory Response to Larval Migration in the Murine Model. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 99(4):393-398, 2004.

Smith JL, Bowman DD, Little MD. Life cycle and development of *Lagochilascaris sprenti* (Nematoda: Ascarididae) from opossums (Marsupialia: Didelphidae) in Louisiana. *J Parasitol*. 69:736-745, 1983.

Sprent JFA. Speciation and development in the genus *Lagochilascaris*. *Parasitology*, 62:71-112, 1971.

Veloso MGP, Faria MCAR, Freitas JD, Moraes MAP, Gorini DF, Mendonça JLF. *Lagochilascariase humana* sobre três casos encontrados no Distrito Federal, Brasil. *Rev Inst Med Trop*. 34:587-591, 1992.

Vidotto O, Araújo P, Astigas PG, Reis ACF, Viotti NMA, Pereira ECP, Yamamura NH. Caso de *Lagochilascaris minor* em cão. In: *Congresso da sociedade Brasileira de Parasitologia*, 7. Resumos. p. 76, 1982.

Volcan GS, Medrano CE, Payares G. Experimental heteroxenous cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda: Ascarididae), in white mice and cats. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 87:525-532, 1992.

Winckel EEF & Treurniet AE. Infestation with *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Doc Med Geo Trop*. 8:23-8, 1956.

**5. ARTIGO:**

**MANUSCRITO A SER SUBMITIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA  
“VETERINARY PARASITOLOGY”.**

**TÍTULO:****CARACTERIZAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS (*Mus musculus*) C57BL/6 E B10.A À INFECÇÃO POR *Lagochilascaris minor* E SUA ATUAÇÃO COMO HOSPEDEIRO DEFINITIVO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL.**

Alessandra G. PÁDUA<sup>1,2</sup>, Mariana F. PRUDENTE<sup>1</sup>, Jaqueline G.A. FREITAS<sup>1</sup>, Elbio C. PAULA<sup>1,2</sup>, Ruy S. LINO JÚNIOR<sup>1</sup>, Ana Paula JUNQUEIRA-KIPNIS<sup>1</sup>, Mara S. CARVALHAES<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia Parasitologia, Imunologia, e Patologia. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Rua 235 esquina com 1º avenida. Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia-GO. <sup>2</sup>Setor de Anatomia Patológica. Hospital Araújo Jorge. Av. Universitária. Setor Universitário. CEP 74605-160, Goiânia-GO.

**Descritores:** *Lagochilascaris minor*, Camundongos isogênicos, Hospedeiro definitivo, B10.A, C57BL/6.

## RESUMO

A lagochilascariase é uma infecção causada por *Lagochilascaris minor*, parasito causador de lesões debilitantes da região cervical de humanos, que apesar de não constituir um problema de saúde pública, é emergente devido ao crescente número de casos no Brasil. Camundongos C57BL/6 e B10.A foram inoculados por via oral com 2000 ovos viáveis de *L. minor* com o intuito de analisar aspectos parasitológicos, morfológicos, histopatológicos e sobrevida. Camundongos C57BL/6 apresentaram maior número de nódulos (machos, 330; fêmeas, 210) que os camundongos B10.A (machos, 225; fêmeas, 110) aos 90 dias após infecção. Larvas (L3/L4) e vermes adultos foram encontrados nos nódulos de ambas as linhagens, mas não houve diferença quanto ao tamanho e largura das mesmas. Infiltrados inflamatórios focais de menor intensidade predominaram no fígado de camundongos C57BL/6 aos 15 dias de infecção, enquanto no mesmo período, em camundongos B10.A houve presença em maior intensidade de infiltrados inflamatórios focais mais bem formados. Camundongos C57BL/6 apresentaram infiltrado inflamatório difuso pulmonar, do início ao final do período avaliado, de maior gravidade que os apresentados por animais B10.A, principalmente após 120 dias de infecção. Em ambas as linhagens observamos no pulmão granulomas císticos contendo larvas L3 integras ou em início de degeneração, dos 45 aos 210 dias de infecção; entretanto, camundongos B10.A apresentaram formação precoce (60 dias após infecção) de infiltrados inflamatórios focais sem presença de larvas L3 no pulmão, quando comparados aos animais da linhagem C57BL/6 (120 dias após infecção). A análise de sobrevida durante 360 dias de infecção em ambas as linhagens, demonstrou que camundongos B10.A (44%) sobreviveram um pouco mais do que os camundongos C57BL/6 (39%), sendo esta diferença estatisticamente significativa. Estes dados evidenciam que animais B10.A são pouco mais resistentes à infecção por *L. minor* que camundongos C57BL/6, mas esta diferença é estatisticamente significativa; e que animais das duas linhagens podem atuar como hospedeiro definitivo e intermediário na infecção experimental.

## ABSTRACT

*Lagochilascaris minor* is the causative agent of lagochilascariase, a disease that affects the neck region causing exsudative abscesses with eggs, adult parasites and L3/L4 larvae within purulent exsudates. Nowadays, lagochilascariasis is considered an emerging disease because of the increased number of cases registered. C57BL/6 and B10.A isogenic mice were infected with 2000 viable eggs and the infection was characterized by histopathology, survival rate and parasitological findings. C57BL/6 showed a higher number of nodules at 90 days post infection (male: 330; female: 210) than B10.A mice (male: 225; female: 110). L3/4 larvae and adult parasite were found in both lineages. It was not observed differences on weight and width of the larvae during all periods studied. Comparing lungs and liver, they showed distinct lesions on infected C57BL/6 and B10.A. The lesions on C57BL/6 mice were mainly diffuse and conversely, B10.A infected mice showed diffuse lesions accompanied of foccal organized lesions in the lungs and liver during part of the studied period. B10.A showed a small, but statistically significant, increased survival rate compared to C57BL/6 mice infected with *L. minor*. Taken together, these results showed that B10.A mice are resistant to the lagochilascariase infection than C57BL/6, but not much more. Also it was observed that both, B10.A and C57BL/6 can be definitive or intermediate host for *Lagochilascaris minor*.

## INTRODUÇÃO

Lagochilascariase é uma infecção causada por *Lagochilascaris sp*, que se localiza no pescoço, mastóide, maxilas, tonsilas, retrofaringe, ouvido médio e cavidade ocular de seres humanos (Draper & Buckley 1963, Volcan *et al.* 1982, Fraiha *et al.* 1983, Paçô 1994, Paçô & Campos 1998). Esta parasitose é causada por parasitos do gênero *Lagochilascaris*, sendo *Lagochilascaris minor* segundo os registros literários, a espécie mais importante para o homem. A infecção humana por *L. minor* apesar de não constituir um problema de saúde pública, é emergente devido ao crescente número de casos no Brasil (Draper & Buckley 1963). As lesões são usualmente crônicas, com formação de abscessos e fístulas, por onde são expelidos parasitos adultos vivos, larvas e ovos, junto com material purulento, pelo nariz ou pela boca, às vezes associada à tosse ou espirro, e a presença de todas as fases de desenvolvimento do parasito nas lesões leva a ocorrência do ciclo auto-infectante (Leão *et al.* 1978, Fraiha 1989, Campos *et al.* 1992, Volcan *et al.* 1992).

O hospedeiro natural definitivo de *L. minor* permanece até hoje desconhecido, sendo a lagochilascariase uma doença relatada apenas no continente americano e sua epidemiologia permanece obscura no que diz respeito aos mecanismos de infecção humana e animal (Sprent 1971). No Brasil, o primeiro encontro deste parasito foi descrito por Artigas *et al.* (1968), em um caso autóctone com amostra retirada do pescoço de uma paciente (Fraiha *et al.* 1983, Campos *et al.* 1991, Paçô & Campos 1998). Estudos experimentais sugerem que a transmissão da lagochilascariase humana ocorra pela ingestão de carne crua ou mal cozida de animais silvestres, provavelmente roedores, contendo larvas de 3º estágio do parasito (Sprent 1971).

O ciclo experimental de *L. minor* envolvendo roedores como hospedeiros intermediários (camundongos e hamster) e carnívoros como hospedeiros definitivos (gatos e cães) foi demonstrado por Paço (1994) e Campos *et al.* (1992) com base na hipótese de Smith *et al.* (1983). A infecção por *L. minor* em camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, induz uma resposta inflamatória neutrofílica com

participação de eosinófilos, células mononucleares e fibrose, que se inicia 4 horas pós-infecção e se estende até 24 horas. No parênquima pulmonar foram observadas reações granulomatosas, constituídas por células gigantes de corpo estranho a partir dos 13 dias pós-infecção, com presença marcante de eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório perivascular (Semerene *et al.* 2004).

A resistência e a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos isogênicos têm contribuído para o entendimento da resposta imune aos diversos parasitos. Enquanto camundongos C57BL/6 têm-se mostrado resistentes a diversas infecções tais como *Leishmania sp* e *Angiostrongylus costaricensis*, camundongos B10.A mostram-se susceptíveis às mesmas infecções e outras como paracoccidiodomicose (Junqueira-Kipinis 1999).

Camundongos B10.A infectados com *L. minor* apresentaram nódulos embestados na musculatura esquelética contendo larvas L3/L4 do parasito circundado por intenso infiltrado inflamatório contendo polimorfonucleares, neutrófilos e eosinófilos e principalmente macrófagos xantomatosos ou espumosos aos 60 dias pós-infecção. Já os camundongos A/J, apresentaram nódulos na musculatura esquelética circundados por discreto infiltrado inflamatório contendo polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos (Freitas *et al.* 2003). A avaliação da sobrevida cumulativa nas mesmas sugeriram que os camundongos da linhagem A/J fossem mais resistentes (sobrevida: 95%) à infecção por *L. minor* que os camundongos B10.A (sobrevida: 40%). not much more

Correlacionando os resultados já descritos na literatura, decidimos avaliar se a susceptibilidade de camundongos isogênicos B10.A à infecção por *L. minor* estaria ou não associada às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP). Para tanto, comparou-se camundongos isogênicos congênicos C57BL/6 e B10.A, que diferem apenas nas moléculas de CHP no modelo experimental com *L. minor*.

## **MATERIAL E METÓDOS**

### **A. Parasitos**

O isolado de *Lagochilascaris minor* utilizado neste estudo para manutenção do ciclo evolutivo foi doado por Campos *et al.* (1992). Os ovos foram obtidos por dissecação do útero de fêmeas e mantidos em solução formalina a 1%, constituindo a fase infectante do parasito. O parasito foi mantido em laboratório utilizando-se camundongos C57BL/6 (*Mus musculus*) como hospedeiro intermediário, inoculados com 2.000 ovos viáveis de *L. minor* e gatos domésticos (*Felis catus domesticus*) como hospedeiro definitivo experimental. Os gatos foram individualmente alimentados com carcaça de camundongos C57BL/6 infectados, contendo aproximadamente 60 nódulos encistados no tecido subcutâneo com larvas de terceiro estágio (L3) de *L. minor*.

### **B. Inóculo**

Os ovos de *L. minor* foram colhidos das fezes dos gatos após 30 dias de infecção e submetidas ao método de Hoffman e Faust. Os ovos assim obtidos foram mantidos em tubo de polipropileno contendo solução formalina a 1%, por 40 dias à temperatura de 25°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados 3 vezes em solução fisiológica, onde retirou-se 3 alíquotas de 1 µl, as quais foram examinadas entre lamina e lamínula, com auxílio de microscópio de luz (10X). A concentração de ovos por mL foi calculada através do emprego de uma regra de três simples sobre o resultado da média aritmética das contagens. Os ovos foram mantidos em formalina, sendo retirados e colocados em água destilada para inoculação. A inoculação esofágica foi realizada com auxílio de cânula (Paço & Campos 1998).

### **C. Animais e vias de inoculação.**

Foram utilizados um total de 122 camundongos isogênicos C57BL/6 (35 fêmeas e 35 machos) e B10.A (26 fêmeas e 26 machos), com idade variando de 32 a 60 dias, mantidos no biotério do IPTSP da UFG com livre acesso a água e ração. Os camundongos foram inoculados por via oral através de sonda esofágica (0,2 mL)

com 2.000 ovos infectantes de *L. minor* e sacrificados por deslocamento cervical aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias pós-infecção. Como controles, foram utilizados 30 camundongos (15 machos e 15 fêmeas de cada linhagem) inoculados com solução salina. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG.

#### **D. Quantificação dos nódulos, mensuração das larvas L3, identificação das formas jovens/adultas do parasito:**

Para cada ponto experimental foram utilizados um a dois animais controles e 3 infectados de cada linhagem (machos e fêmeas). Após o sacrifício nos diferentes dias, os camundongos foram fixados em placas de isopor com alfinetes, tendo sua pele rebatida, sendo realizada necropsia através da abertura das cavidades craniana, torácica e abdominal com retirada de linfonodos, baço, fígado, pulmão, tecidos subcutâneo e muscular. A quantidade de nódulos foi determinada em cada animal por mesoscopia. No mínimo 3 nódulos contendo larvas foram colhidos de cada camundongo infectado, as larvas foram retiradas dos nódulos nos diferentes dias pós-infecção, fixadas a quente em formalina a 10% e clarificadas em lactofenol entre lâmina e lamínula. Após clarificação, foram mensuradas quanto ao comprimento e diâmetro pela técnica de morfometria computadorizada (Axion Vision 3.1 Zeiss). Após a mensuração das larvas, nos períodos de 120, 150, 180 e 210 dias pós-infecção, as mesmas foram coradas pela técnica de coloração para helmintos (Carmim) em seguida, montadas entre laminas e lamínulas e analisadas em microscópio quanto sua morfologia (Amato 1985).

#### **E. Histopatologia.**

Realizou-se evisceração completa e observação macroscópica de fígado, pulmão, baço, linfonodos e tecidos subcutâneo e muscular que foram fixados em formalina a 10%, pH 7.4. O material foi processado pelos métodos habituais de inclusão em parafina, seccionado em micrótomos rotativos com espessura de 5µm, corado pela hematoxilina-eosina (H & E) e montado entre lâmina e lamínula de vidro, com verniz. A análise dos infiltrados inflamatórios focais presentes nos pulmões e no

fígado foi realizada determinando-se as lesões presentes nos cortes de tecido corados pela H&E.

#### **F. Sobrevida após infecção com *Lagochilascaris minor*:**

Para o ensaio da sobrevida foram utilizados 132 camundongos: 15 machos e 15 fêmeas infectadas, e 15 machos e 15 fêmeas controles da linhagem C57BL/6; 18 machos e 18 fêmeas infectados e 18 machos e 18 fêmeas controles da linhagem B10.A. Os camundongos infectados foram inoculados com 2.000 ovos viáveis de *L. minor* através de sonda esofágica e os controles com solução salina. A mortalidade foi acompanhada diariamente por um período de 360 dias, utilizando-se uma ficha controle onde foram anotadas as relações entre camundongos mortos e vivos. A sobrevida foi calculada através do método Kaplan-Meier e comparada através de Log rank test.

#### **G. Análise estatística**

Para todos os experimentos utilizou-se o teste “t de student” e ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Para a sobrevida utilizou-se o método Kaplan-Meier.

## RESULTADOS

A resistência e a susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos isogênicos têm contribuído para o entendimento da resposta imune aos diversos parasitos. Enquanto C57BL/6 tem se apresentado resistente a diversas infecções tais como *Leishmania sp* e *Angiostrongylus costaricensis*, os camundongos B10.A mostram-se susceptíveis às mesmas infecções ou outras como paracoccidiodomicose (Junqueira-Kipnis, 1999). Com o intuito de definir um padrão de resistência e susceptibilidade à infecção experimental por *Lagochilascaris minor*, estas linhagens foram infectadas e analisadas comparativamente durante 360 dias.

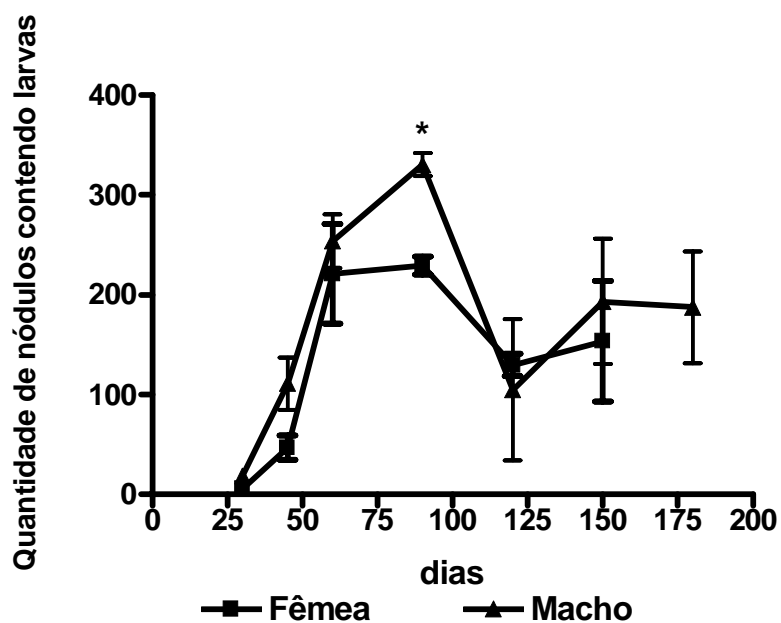
### 1. Parâmetros Parasitológicos:

#### A. Contagem de nódulos.

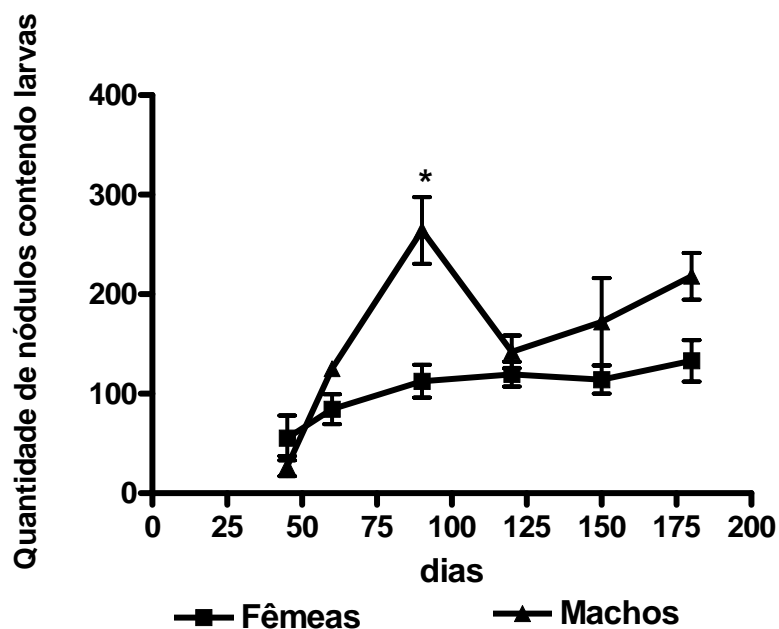
Estudos realizados em camundongos inoculados por via oral com ovos infectantes de *L. minor* demonstram: eclosão de larvas no intestino, migração para o fígado, pulmões e encistamento na musculatura esquelética e, tecido subcutâneo (Campos *et al.* 1992, Farah *et al.* 2004). Para verificar se havia diferenças na progressão da infecção entre as linhagens estudadas, analisamos a quantidade de nódulos presentes em camundongos C57BL/6 e B10.A machos e fêmeas após infecção com *L. minor*.

Camundongos C57BL/6 machos e fêmeas apresentaram aumento constante de nódulos aos 30, 45 e 90 dias de infecção, aos 90 dias comparando-se fêmeas e machos infectados houve uma preponderância de nódulos nos tecidos dos camundongos machos (330 nódulos, \* $p < 0,05$ ). Após este período observou-se um decréscimo no número de nódulos estendendo-se até os 150 dias (Figura 1).

Camundongos B10.A, de ambos os sexos, apresentaram nódulos depois de 45 dias de infecção. Após este período, camundongos B10.A machos apresentaram número superior de nódulos do que as fêmeas (machos: 255 nódulos, fêmeas: 110 nódulos,  $p < 0,05$ ). Semelhante aos camundongos C57BL/6, o número máximo de nódulos foi obtido aos 90 dias de infecção, quando os animais machos apresentaram também número superior de nódulos que as fêmeas (\* $p < 0,05$ ). (Figura 2).



**Figura 1.** Número de nódulos musculares e subcutâneos visíveis contendo larvas de *Lagochilascaris minor* em camundongos C57BL/6 fêmeas e machos. Os camundongos foram inoculados com 2.000 ovos viáveis do parasito e foram analisados aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 dias pós-infecção. \*Análise estatística determinada pelo teste *t* de *student* ( $p < 0,05$ ).



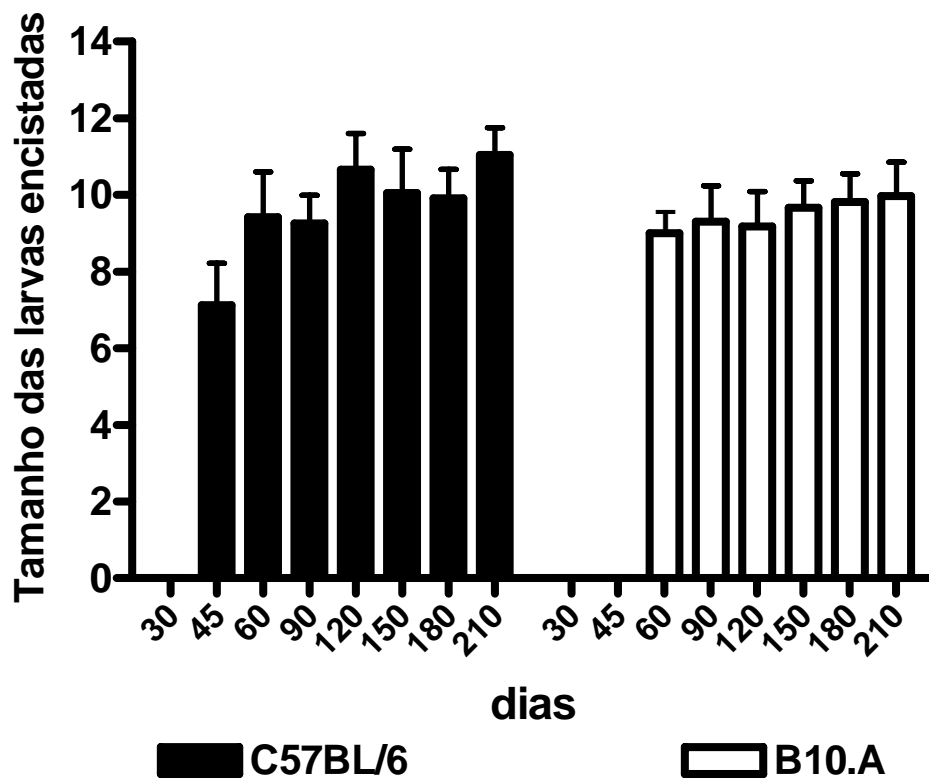
**Figura 2.** Número de nódulos musculares e subcutâneos visíveis contendo larvas de *Lagochilascaris minor* em camundongos B10.A fêmeas e machos. Os camundongos foram inoculados com 2.000 ovos viáveis do parasito e foram analisados aos 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 dias pós-infecção. \*Análise estatística determinada pelo teste *t* de *student* ( $p < 0,05$ ).

A progressão da infecção nas duas linhagens demonstrou que em camundongos C57BL/6, os nódulos podem ser visualizados a partir dos 30 dias de infecção, ao contrário do que acontece em camundongos B10.A onde, esses nódulos foram visualizados depois dos 45 dias de infecção. Comparando as duas linhagens, no entanto, camundongos B10.A. As fêmeas apresentaram menor número de nódulos do que C57BL/6 (\* $p < 0,05$ ) e machos das duas linhagens apresentam mais nódulos que as fêmeas, com diferença estatisticamente significativa somente aos 90 dias de infecção.

### **B. Mensuração das larvas de *Lagochilascaris minor*.**

Com as observações de que a presença de nódulos em camundongos C57BL/6 ocorre mais precocemente em relação aos camundongos B10.A, resolvemos investigar se as larvas encistadas nos nódulos dessas linhagens apresentariam tamanho e estruturas diferenciadas, retiramos uma média de 5 larvas de cada nódulo em cada camundongo.

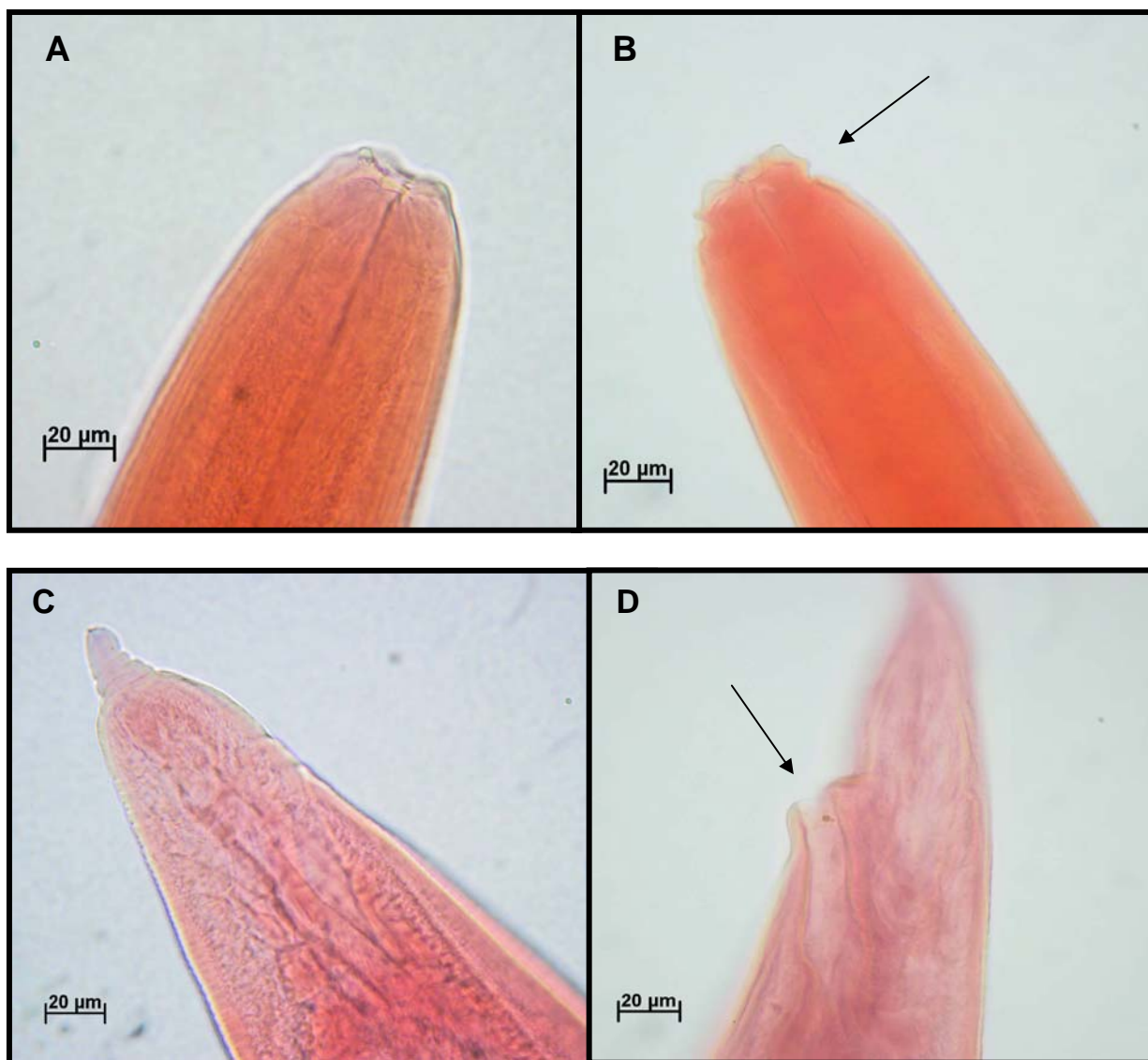
As larvas L3/L4 estatisticamente mantiveram o mesmo tamanho no decorrer do período analisado e não houve diferença significativa no tamanho e largura dessas larvas quando comparadas entre si no mesmo ponto experimental tanto em C57BL/6 quanto em B10.A. As larvas encontradas em camundongos C57BL/6 apresentaram tamanho de 7,2 a 11,0 mm de comprimento, enquanto que as larvas de B10.A o tamanho foi de 9,0 a 10,0 mm, não havendo diferença no tamanho dessas larvas dependente do sexo do hospedeiro (Figura 3).



**Figura 3.** Mensuração do comprimento das larvas de *Lagochilascaris minor*, obtidas de camundongos C57BL/6 e B10.A aos 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias pós-infecção através da técnica de morfometria computadorizada.

### **C. Parasitos jovens e adultos em camundongos C57BL/6 e B10.A.**

Como o tamanho das larvas encontradas nos nódulos dos camundongos C57BL/6 e B10.A eram semelhantes ao tamanho dos parasitos adultos, avaliamos as amostras do parasito quanto a sua morfologia para confirmar a presença de exemplares adultos. A análise morfológica dos exemplares obtidos dos nódulos de linhagens C57BL/6 e B10.A infectados com *L. minor* demonstrou a presença de larvas L3 e L4 assim como parasitos adultos, nos nódulos presentes em ambas as linhagens. Os parasitos adultos foram encontrados nestes animais apenas após 180 dias pós-infecção (Figura 4).



**Figura 4.** Parasitos jovem e adulto retirado de nódulos de camundongos C57BL/6 e B10.A aos 180 dias após infecção. Coloração por Carmum. **A.** Extremidade anterior do parasito jovem. **B.** extremidade anterior do parasito adulto. Observar o colar pós-labial (seta). **C.** Extremidade caudal do parasito jovem. **D.** Extremidade caudal do parasito adulto macho (seta).

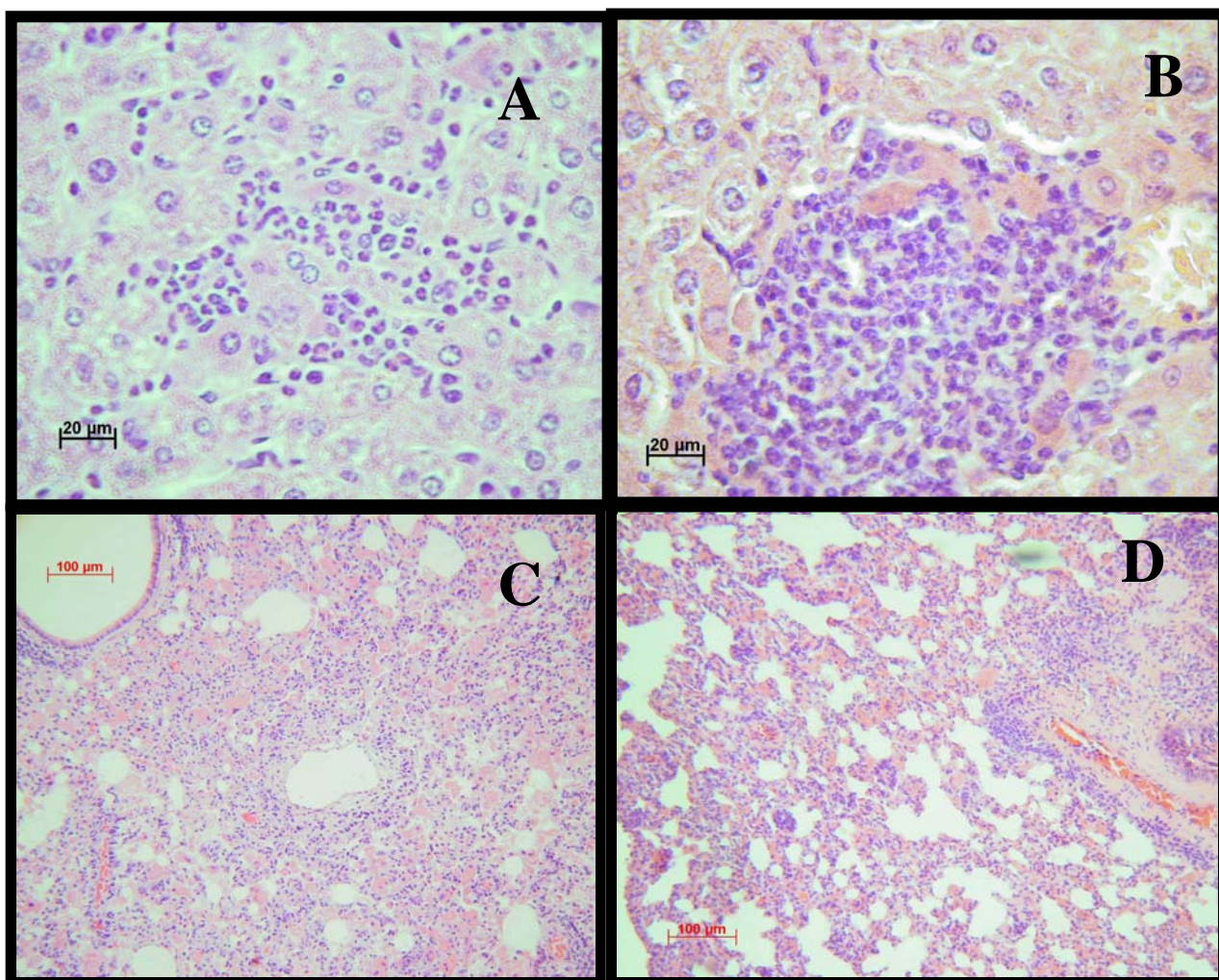
## 2. Padrão histopatológico das lesões.

Foram avaliados histopatologicamente linfonodos, baço, fígado, pulmão e tecidos subcutâneo e muscular lesados. As lesões entre as duas linhagens de camundongos infectados foram semelhantes na maioria dos órgãos analisados e se assemelhavam aos dados da literatura, no entanto, no fígado e nos pulmões observamos diferenças peculiares. Por isso, apresentamos aqui apenas os resultados referentes às lesões encontradas no fígado e pulmão.

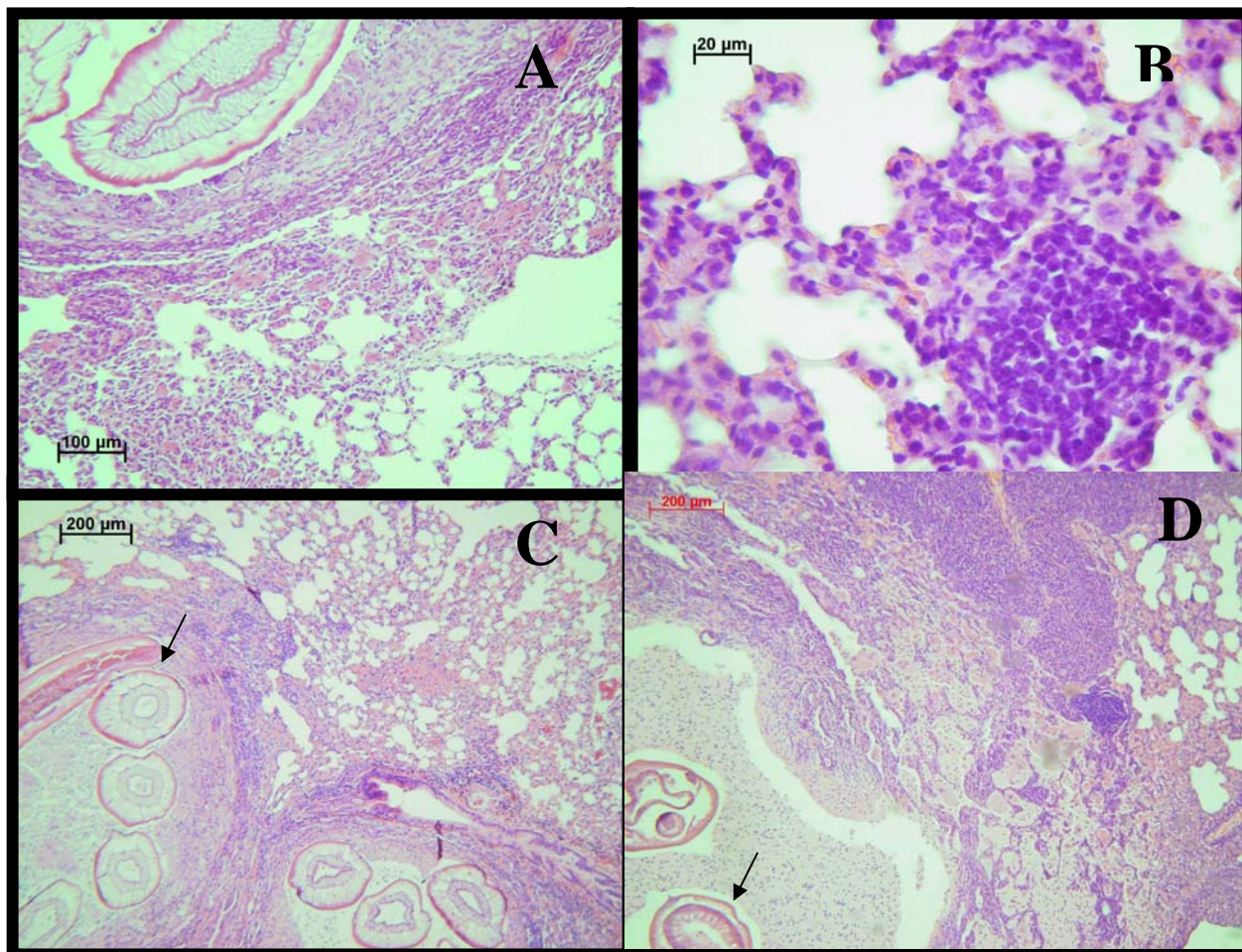
Camundongos C57BL/6 infectados com *L. minor* apresentaram no fígado, aos 15 dias de infecção, lesões inflamatórias focais pouco organizadas, compostas por células mononucleares e polimorfonucleares (Figura 5A), que regrediram nos pontos subseqüentes. No mesmo período, observamos nos camundongos B10.A poucos infiltrados inflamatórios menos organizados contendo células mononucleares e polimorfonucleares, e infiltrados inflamatórios focais bem organizados compostos de células mononucleares e polimorfonucleares (Figura 5B).

No pulmão de camundongos C57BL/6, aos 60 dias de infecção, observamos: infiltrados inflamatórios difusos acentuados ou moderados com células gigantes e pneumócitos (Figura 5 C); presença eventual de granuloma cístico contendo larvas. Em camundongos B10.A, no mesmo período, observamos: infiltrados inflamatórios difusos com células gigantes e pneumócitos, de intensidade moderada ou acentuada (5D); pequenos infiltrados inflamatórios focais (6B); eventual granuloma cístico contendo larvas.

A partir dos 120 dias de infecção, observamos infiltrados inflamatórios difusos mais acentuados nos camundongos C57BL/6, acompanhados por presença de infiltrados inflamatórios focais sem larvas. Granulomas contendo larvas mortas e vivas estiveram presentes até o final do período avaliado, em camundongos B10.A (Figura 6 D) e C57BL/6 (Figura 6 A e C), apresentando pequenas diferenças quanto a celularidade.



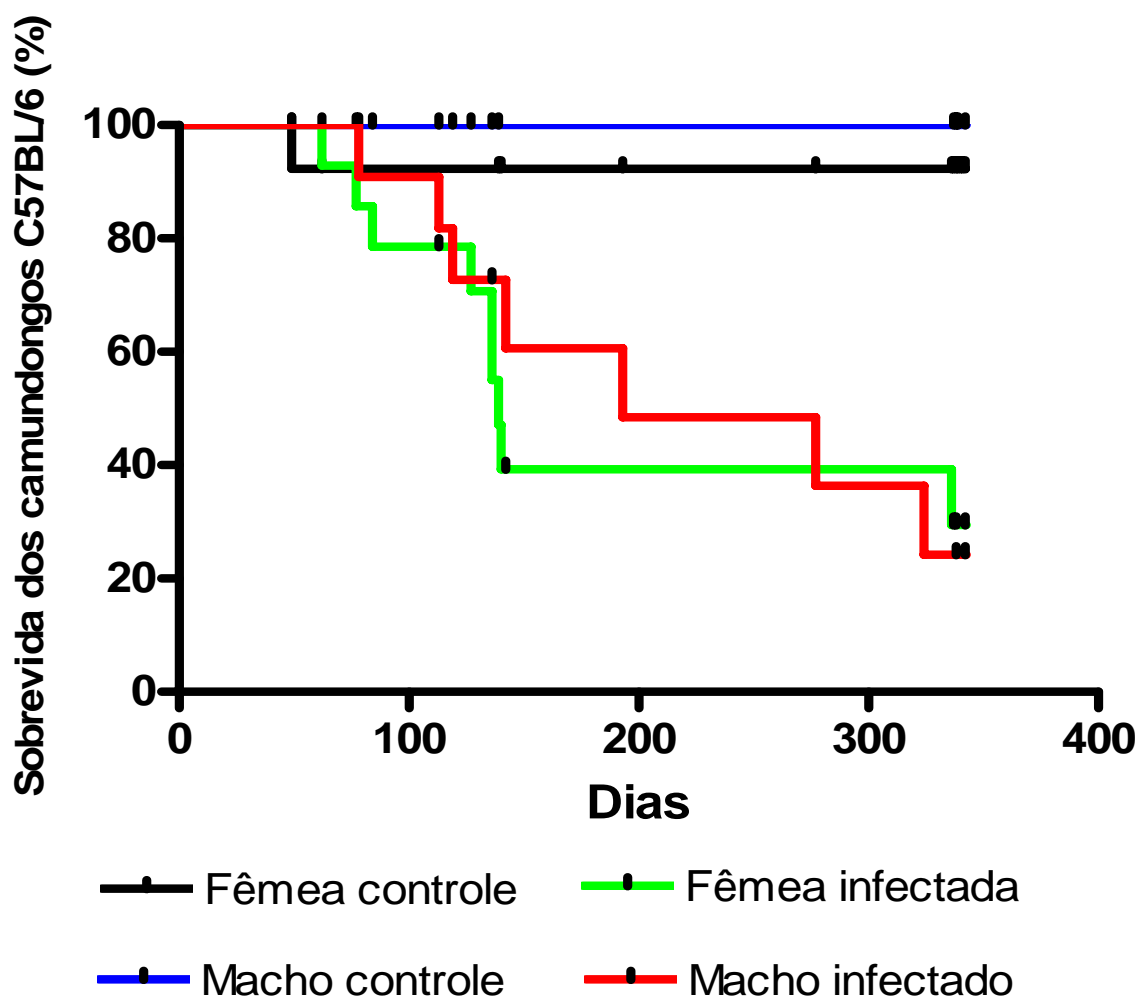
**Figura 5.** Cortes de fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 e B10.A infectados com 2000 ovos viáveis de *Lagochilascaris minor*. Coloração pela hematoxilina-eosina. **A-B: 15 dias de infecção.** **A.** Fígado de camundongo C57BL/6 com infiltrado inflamatório focal menos denso, composto por macrófagos e polimorfonucleares. **B.** Fígado de camundongo B10.A com infiltrado inflamatório focal composto por macrófagos e polimorfonucleares. **C-E:** 60 dias de infecção. **C.** Pulmão de camundongo C57BL/6 com infiltrado inflamatório difuso acentuado composto por células mononucleares e pneumócitos. **D.** Pulmão de camundongo B10.A com infiltrado inflamatório difuso moderado, composto por células mononucleares e pneumócitos.



**Figura 6.** Cortes de pulmão de camundongos C57BL/6 e B10.A infectados com 2.000 ovos de *Lagochilascaris minor*. Coloração pela hematoxilina-eosina. **A-B: 60 dias de infecção.** **A.** Pulmão de camundongo C57BL/6 apresentando granuloma cístico ao redor de larvas aparentemente íntegras. **B.** Pulmão de camundongo B10.A apresentando infiltrado inflamatório focal, bem formado, sem presença de larva, que aparece juntamente com os infiltrados inflamatórios difusos. **C-D: 120 dias de infecção.** **C.** Pulmão de camundongo C57BL/6 contendo larvas aparentemente íntegras, encistadas por formação granulomatosa (seta). **D.** Pulmão de camundongo B10.A com granuloma cístico ao redor de larvas aparentemente íntegras.

### 3. Sobrevida dos camundongos C57BL/6 infectados com *Lagochilascaris minor*.

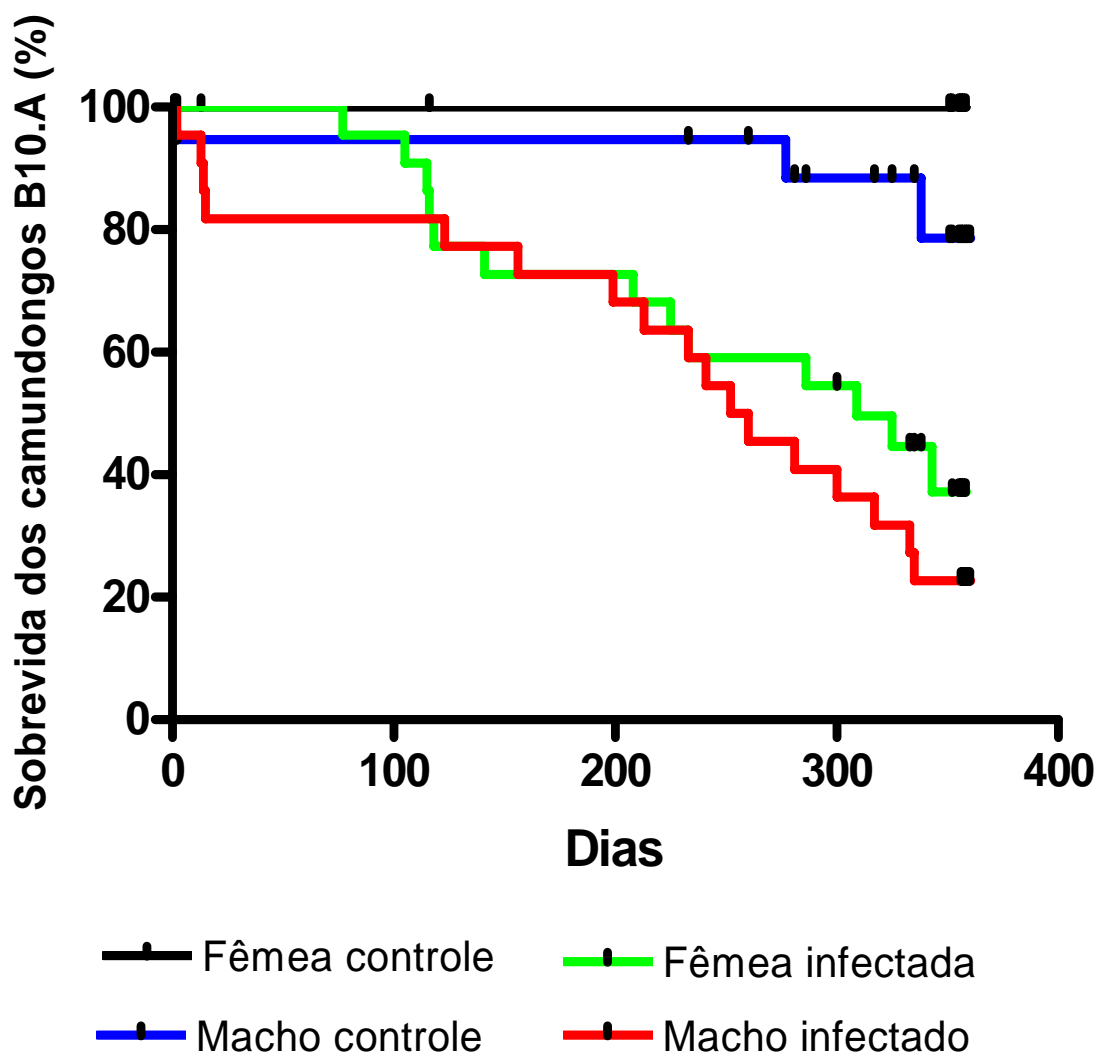
Os animais C57BL/6 fêmeas infectadas com 2.000 ovos viáveis de *L. minor* apresentaram 39% de sobrevida, já o grupo controle apresentou 85% de sobrevida após 360 dias. Camundongos C57BL/6 machos infectados, apresentaram 35% de sobrevida e o grupo controle apresentou 100% de sobrevida durante o mesmo tempo de observação (Figura 7). Estes resultados demonstram que não existe diferença significativa na sobrevida de camundongos C57BL/6 infectados quanto ao sexo, embora exista uma tendência de maior mortalidade nos machos infectados.



**Figura 7.** Análise da sobrevida (%) dos animais C57BL/6 machos e fêmeas, controles e infectados com 2.000 ovos viáveis de *Lagochilascaris minor* acompanhados diariamente no período de 360 dias. Os animais controles foram inoculados por via intra-esofágica com solução salina. Estes resultados foram obtidos pelo método de Kaplan-Meier para determinação da curva de sobrevida. As curvas foram comparadas através do teste *t* de student ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Sobrevida dos camundongos B10.A infectados com *Lagochilascaris minor*.

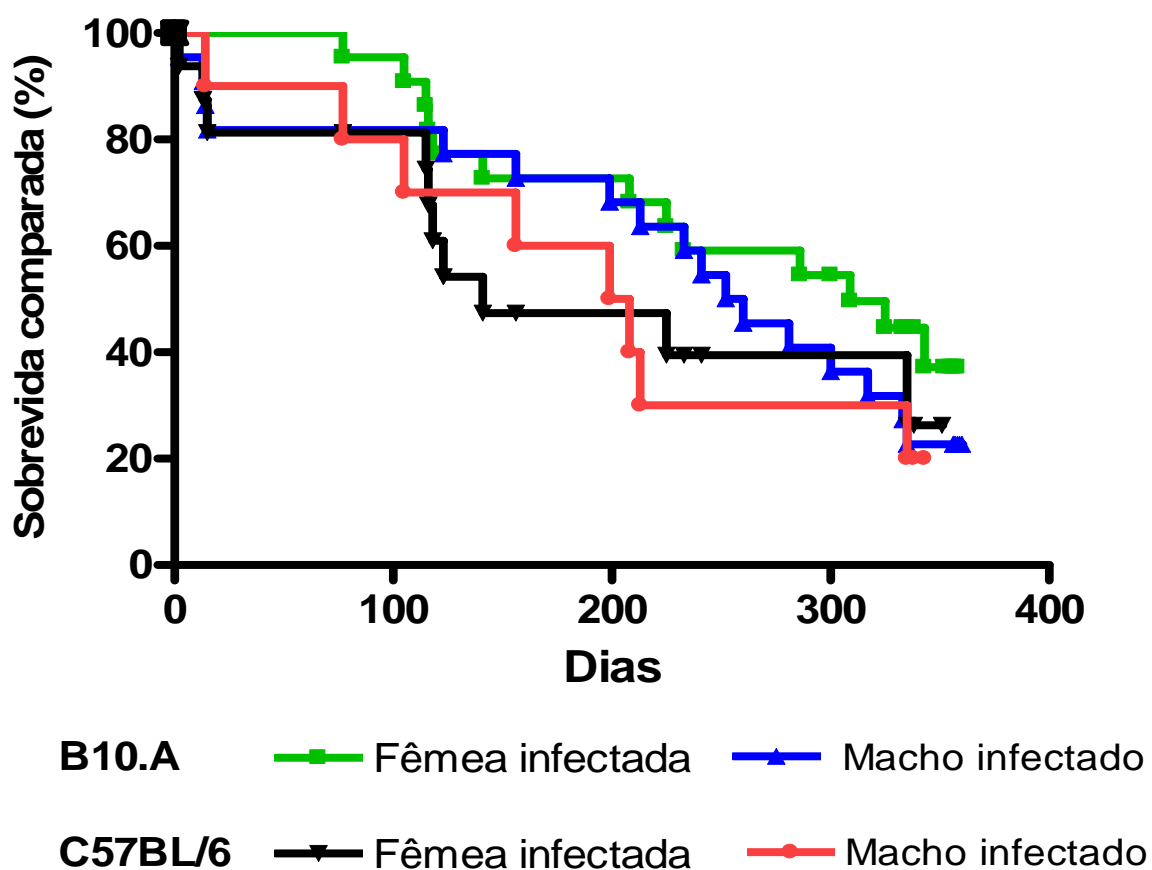
Camundongos B10.A fêmeas infectados com 2.000 ovos viáveis de *L. minor* apresentaram 44% de sobrevida e o grupo controle apresentou 100% de sobrevida após 360 dias de infecção. Camundongos B10.A machos infectados apresentaram 24% de sobrevida, enquanto o grupo controle apresentou 100% de sobrevida durante o mesmo período (Figura 8). Fêmeas de camundongos B10.A infectadas com *L. minor* apresentam sobrevida maior do que os machos. ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8.** Análise da sobrevida (%) dos animais B10.A machos e fêmeas, controles e infectados com 2.000 ovos viáveis de *Lagochilascaris minor* acompanhados diariamente no período de 360 dias. Os animais controles foram inoculados por via intra-esofágica com solução salina. Estes resultados foram obtidos pelo método de Kaplan-Meier para determinação da curva de sobrevida. As curvas foram comparadas através do teste *t* de *student* ( $p < 0,05$ ).

### 5. Sobrevida comparada dos camundongos C57BL/6 e B10A infectados com *Lagochilascaris minor*.

A análise comparativa da sobrevida dos camundongos C57BL/6 e B10.A infectados com *L. minor* demonstrou que camundongos B10.A fêmeas sobrevivem um pouco mais do que os camundongos C57BL/6 de ambos os sexos ( $p < 0,05$ ), (Figura 9).



**Figura 9.** Análise da sobrevida comparada (%) dos animais C57BL/6 e B10.A machos e fêmeas, controles e infectados com 2.000 ovos viáveis de *Lagochilascaris minor* acompanhados diariamente no período de 360 dias. Os animais controles foram inoculados por via intra-esofágica com solução salina. Estes resultados foram obtidos pelo método de Kaplan-Meier para determinação da curva de sobrevida. As curvas foram comparadas através do teste *t* de *student* ( $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO:

Camundongos C57BL/6 e B10.A foram infectados com 2.000 ovos viáveis de *Lagochilascaris minor*. Camundongos C57BL/6 fêmeas apresentaram maior número de nódulos do que os camundongos B10.A, sendo que esta diferença não foi estatisticamente significativa para camundongos machos. Nos nódulos dos camundongos C57BL/6 e B10.A foram encontradas larvas L3/L4 e vermes adultos. Não houve diferença quanto ao tamanho e largura das mesmas em ambas as linhagens. Quanto às lesões teciduais, apesar de na maioria dos órgãos analisados (baço, linfonodos, pele, tecido subcutâneo e músculo esquelético) não ter havido diferença entre as duas linhagens, nos pulmões e no fígado foram observadas diferenças importantes. Em camundongos C57BL/6, as lesões pulmonares foram difusas e acentuadas, enquanto que nos camundongos B10.A observou-se lesões difusas moderadas acompanhadas por pequenos infiltrados inflamatórios focais sem larvas. Em ambas as linhagens observamos granulomas circundando as larvas, até a fase crônica da infecção. A análise da sobrevivência de ambas as linhagens demonstrou que camundongos B10.A apresentam sobrevivência pouco maior que os camundongos C57BL/6 infectados com *L. minor*. Também foi observado que as fêmeas dos camundongos B10.A sobreviveram mais do que os machos infectados. Este trabalho evidencia que os camundongos B10.A são pouco mais resistentes à infecção por *L. minor* do que os camundongos C57BL/6 e que as duas linhagens podem atuar como hospedeiros definitivos da infecção.

Trabalhos anteriores demonstraram que camundongos isogênicos que continham o mesmo haplótipo das Moléculas de Histocompatibilidade Principal (CHP) e *background* genético diferentes (A/J e B10.A) infectados com *L. minor* respondiam à infecção de maneiras distintas (Freitas *et al.* 2003, Pádua *et al.* 2003). Camundongos A/J quando comparados aos camundongos B10.A eram muito mais resistentes à infecção. Será que esta resistência estaria associada às moléculas de CHP ou aos genes vinculados ao “background” genético dos animais? Para responder este propósito utilizamos camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 e B10.A que apresentam o mesmo “background genético”, mas moléculas de CHP diferentes (C57BL/6: H-2<sup>b</sup>, B10.A: H-2<sup>a</sup>).

Semerene *et al.* (2004) descreveram a presença de nódulos aos 47 dias após infecção em camundongos C57BL/6 disseminados no tecido subcutâneo e na musculatura esquelética, tornando mais visíveis e maiores aos 61 dias após infecção. Aos 120 dias após-infecção os nódulos encontravam-se disseminados por toda musculatura esquelética. Comparando a quantidade de nódulos após a infecção intra-esofagiana de camundongos B10.A e A/J. Pádua *et al.* (2003) demonstraram que camundongos A/J são mais resistentes à infecção, pois apresentaram menor número de nódulos e baixa mortalidade.

Nossos resultados demonstram que a quantidade de nódulos observados durante a necropsia nos camundongos C57BL/6 foi ligeiramente maior do que nos camundongos B10.A. Vale ressaltar que os nódulos foram visualizados em camundongos C57BL/6, a partir dos 30 dias após infecção, enquanto que nos camundongos B10.A começaram a ser visualizados a partir dos 45 dias de infecção. A quantidade de nódulos foi maior em camundongos machos, tanto em C57BL/6 quanto em B10.A, aos 90 dias após a infecção.

A presença de formas adultas do parasito foi confirmada em ambas as linhagens. Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por Freitas *et al.* (2003) para os camundongos B10.A e A/J infectados com *L. minor*. A mensuração das larvas L3/L4 nas linhagens estudadas permitiu observar que as mesmas mantiveram o mesmo tamanho no decorrer do período analisado.

Em nosso trabalho o encontro de formas adultas de *L. minor* em camundongos C57BL/6 e B10.A, sugere que estes animais possam atuar tanto como hospedeiro definitivo quanto intermediário. É necessária uma reavaliação dos modelos animais utilizados neste ciclo experimental quanto à resposta dos animais diante da infecção, assim como os mecanismos que poderiam estar levando ao desenvolvimento das formas adultas do parasito. Muito ainda precisa ser estudado quanto à dinâmica da reprodução deste parasito no camundongo (e outros roedores), uma vez que a postura de ovos torna-se inviabilizada nos camundongos devido ao fato de que parasitos adultos (machos e fêmeas) normalmente não são encontrados no mesmo nódulo.

Semerene *et al.* (2004) ao analisarem a cinética da resposta inflamatória de *L. minor* em camundongos C57BL/6, descrevem que por volta do décimo terceiro dia após inoculação, ocorre presença de micro abscesso no fígado; e nos pulmões, o aparecimento de reação granulomatosa desorganizada, caracterizada por intenso infiltrado difuso de células gigantes multinucleadas, ocupando a luz alveolar e exibindo material refringente no citoplasma e ainda presença marcante de eosinófilos em meio ao infiltrado inflamatório perivascular. Os pulmões destes animais apresentaram aos 120 dias após infecção, nódulo maduro, reação granulomatosa e perivascularite. Estes resultados corroboram com os nossos resultados, onde foi demonstrado que no fígado e pulmão de camundongos C57BL/6 infectados há presença de infiltrado misto contendo polimorfonucleares e células mononucleares que persistiram ao longo da infecção nos pulmões. Estes animais formam granulomas típicos em torno das larvas. Já camundongos B10.A, apresentaram infiltrados inflamatórios difusos acompanhados de infiltrados inflamatórios focais mononucleares bem definidos nas quais não foram identificadas larvas, e granulomas císticos típicos em torno das larvas.

Apesar dos camundongos C57BL/6 terem sido utilizados para o desenvolvimento do ciclo experimental de *L. minor*, a sobrevivência desta linhagem não foi ainda estudada. Camundongos C57BL/6 apresentam resistência à infecção por *Angiostrongylus costaricensis* e *Trichuris muris* quando comparados a BALB/c (Stefan *et al.* 2001) (Allisson *et al.* 2001). Não há relatos sobre ciclos experimentais utilizando camundongos B10.A infectados com parasitos intestinais tais como *L. minor*, mas quando utilizados em modelos experimentais como *Paracoccidioides brasiliensis* estes animais mostraram-se mais susceptíveis do que camundongos A/J, C57BL/10 e BALB/c (Calich *et al.* 1985). Nossos resultados demonstram que a sobrevivência dos camundongos B10.A (44%) foi maior do que a dos camundongos C57BL/6 (39%) durante 360 dias de infecção evidenciando que os camundongos B10.A são um pouco mais resistentes à infecção por *L. minor* do que os camundongos C57BL/6. Nossos resultados enfatizam ainda que as fêmeas B10.A infectadas sobrevivem mais do que os machos. A resistência de camundongos

C57BL/6 fêmeas à infecção por *Brachylaima cribbi* também foi maior quando comparadas aos machos (Butcher *et al.* 2002).

Animais que apresentam o haplótipo H-2<sup>a</sup> em geral são resistentes a infecções tais como: paracoccidiodomicose, *Salmonella typhimurium* (Calich *et al.* 1985, Maskell *et al.* 1986, Junqueira-Kipnis 1999). De acordo com os achados de Allinson *et al.* (2001), a resistência dos animais esta associada com a quantidade de parasitos envolvidos em uma infecção e com a diferença genética existente entre indivíduos. Neste trabalho, evidenciamos que animais isogênicos com haplótipo H-2<sup>a</sup> são pouco mais resistentes à infecção por *L. minor* do que os camundongos isogênicos que apresentam haplótipo H-2<sup>b</sup>.

Finalmente, concluímos que embora os camundongos B10.A sejam pouco mais resistentes à infecção por *L. minor* que os camundongos C57BL/6, esta diferença é significativa, e que esta resistência pode estar associada, pelo menos em parte, as moléculas de CHP de classe II. De fato, o controle de infecções complexas, tais como a lagochilascariase experimental, normalmente tem caráter poligênico.

## CONCLUSÕES

- A infecção por *Lagochilascaris minor* nos camundongos C57BL/6 induz o aparecimento precoce de nódulos (30 dias pós-infecção) quando comparados aos camundongos B10.A (45 dias pós-infecção).
- Camundongos C57BL/6 apresentam número ligeiramente maior de nódulos quando comparados aos camundongos B10.A.
- Os tamanhos das larvas L3/L4 foram semelhantes nas duas linhagens infectadas.
- Em ambas linhagens evidenciamos a presença de vermes adultos após 180 dias de infecção.
- Camundongos da linhagem B10.A apresentam infiltrados inflamatórios difusos nos pulmões, de gravidade menor do que a apresentada por camundongos C57BL/6.
- Infiltrados inflamatórios focais compostos principalmente de macrófagos e linfócitos foram detectados precocemente em camundongos B10.A .
- Camundongos de ambas as linhagens apresentam granuloma cístico ao redor de larvas, a partir dos 45 dias de infecção.
- Fêmeas de ambas as linhagens apresentam sobrevida maior do que os machos, mas esta diferença é estatisticamente significativa somente para a linhagem B10.A .
- Camundongos isogênicos da linhagem B10.A, experimentalmente infectados por *L. minor*, apresentam sobrevida ligeiramente maior (porém estatisticamente significante) que os camundongos C57BL/6.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison JB, Kathryn JE, Neil EH, Richard KG. The effect of challenge and trickle *Trichuris muris* infections on the polarization of the immune response. *Inter Journal Parasitol.* 31:1627-1637, 2001.

Amato JFR. Manual de Técnicas para a Preparação de Coleções Zoológicas, Platelintos (Temnocefálicos, Trematódeos, Cestóides, Cestodários) e Acantocéfalos, Sociedade Brasileira de Parasitologia 1985.

Artigas Pt, Araújo P, Romiti N and Ruivo M. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Inst Med Trop.* 10:78-83, 1968.

Butcher AR, Palethorp MM, Grove DI. Effects of sex and age on the susceptibility of C57BL/6J mice to infection with *Brachylaima cribbi* and the course of infection in NOD SCID mice. *Parasitol Res;* 88(7):668-74, 2002.

Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Suscetibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidiodes brasiliensis*. *Br J Exp Pathol.* 66:585, 1985.

Campos DMB, Maia MA, Freire-Filha LG, Vieira MA, Carvalho SMD. Infecção por *Lagochilascaris minor*. Registro de um novo caso e iliações de natureza epidemiológica. *Rev Inst Med Trop.* 33 (supl.):S41, 1991.

Campos DMB, Freire-Filha LG, Vieira MA, Paçô JM, Maia MA. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Inst Med Trop.* 34:277-287, 1992.

Draper JW, Bucley JJC. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, from a patiente in Tobago. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 57:7, 1963.

Fraiha H, Rocha MPC, Araújo OJ, Barros VLRS, 1983. Patologia amazônica exótica. II: Infecção humana por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, (Nematoda, Ascarididae). Registro de três novos casos, e formulação de nova hipótese para o mecanismo de infecção. *In: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 8., e Congresso da Federacion Latino-Americana de Parasitólogos, 6, Resumos.* p. 146, 1983.

Fraiha H, Leão RNQ, Costa FSA. Lagochilascariase humana e dos animais domésticos. *Zoon Rev Inst.* 1:25-33,1989.

Freire-Filha LG, Junqueira Kipnis AP, Ribeiro WR, Campos DMB. Avaliação Cito-hematogênica em camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 infectados com ovos de *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. *Rev Patol Trop.* 28(1):14-25, 2001.

Freitas JGA, Pádua AG, Prudente MF, Jesus MC, Eunice B, Campos AP, Campos DMB, Paula EC, Carvalhaes MS. Lagochilascariase experimental em camundongos B10.A e A/J. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36, (supl) I 169, 2003.

Junqueira-Kipnis AP. Contribuição dos modelos murinos no estudo da paracoccidioidomicose. *Rev Patol Trop.* 28 (1):14-25, 1999.

Leão RNQ, Leão Filho J, Dias LB, Calheiros LB. Infecção humana pelo *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. Registro de um caso observado no Estado do Pará (Brasil). *Rev Inst Med Trop.* 20:300-306, 1978.

Leiper RT. A new nematoda worm from Trinidad: *Lagochilascaris minor*. *Proc Zool Soc Lond.* 4:742-743, 1909.

Maskell DJ, Hormaeche CE. Genes within the major histocompatibility complex influence the response to ampicillin therapy and severity of relapse in H-2 congenic,

susceptible Itys mice infected with virulent *Salmonella typhimurium*. *J Immunogenet.* 13 (5-6):451-7, 1986.

Pádua AG, Freitas JG, Prudente MF, Paula EC, Carvalhaes MS. Suscetibilidade a lagochilascariase experimental é independente dos genes do CHP. *Revista de Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia* 235, 2003.

Paçô JM. Roedores de origem silvestre na lagochilascariase experimental. *Instituto de Patologia Tropical e Saúde Publica*. Universidade Federal de Goiás. 1994. (Dissertação de Mestrado).

Paçô JM, Campos DMB. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909: Oitenta e nove anos de revisão bibliográfica. *Rev Pat Trop.* 27(1), 1998.

Semerene AR, Júnior RSL, O JA, Albino VM, Stefani MA, Barbosa AP, Campos DMB. Experimental Lagochilascariosis: Histopathological Study of Inflammatory Response to Larval Migration in the Murine Model. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(4):393-398, 2004.

Smith JL, Bowman DD, Little MD. Life cycle and development of *Lagochilascaris sprenti* (Nematoda: Ascaridae) from opossums (Marsupialia: Didelphidae) in Louisiana. *J Parasitol.* 69:736-745, 1983.

Sprent JFA. Speciation and development in the genus *Lagochilascaris*. *Parasitol.* 62, p.71-112, 1971.

Stefan MG, Elizabeth AS, Peter TS, Wolfgang HH, Alexander WP, Carlos GT, Hartwig SK. Cellular immune responses and cytokine production in BALB/c and C57BL/6 mice during the acute phase of *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Acta Tropica* 80: 59-68, 2001.

Volcan GS, OCHOA FR, Medrano CE, Valera Y. *Lagochilascaris minor* infection in Venezuela. Report of case. *Am J Trop Med HYG.* 31, n°6, p.111-113, 1982.

Volcan GS, Medrano CE, Payares G. Experimental heteroxenous cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda: Ascarididae), in white mice and cats. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 87: 525-532, 1992.