

EXPOSIÇÃO DE OVOS DE *Toxocara canis* AO FUNGO NEMATÓFAGO *Trichoderma virens* - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OVICIDA EM MODELO EXPERIMENTAL

FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO¹; ANELISE DE OLIVEIRA DA SILVA FONSECA²; BEATRIZ MARONEZE²; JÚLIA VALENTE²; CAROLINE BRAGA²; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – fmaia2404@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas anelise_fonseca@yahoo.com.br; beatrizpersici@ibest.com.br; juliassilveira@gmail.com; carolineqbraga@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma doença negligenciada causada pelo nematódeo *Toxocara canis* (CDC, 2013) parasito intestinal de cães. Várias espécies de helmintos podem causar a LMV (*larva migrans visceral*), porém *T. canis* é o nematódeo mais frequentemente associado à doença (DESPOMMIER, 2003).

Segundo BARRIGA (1988) o controle da população canina, a educação da população sobre o potencial zoonótico de *T. canis* e a limitação do acesso de animais às áreas de lazer constituem medidas essenciais para a prevenção da toxocaríase. Adicionalmente, a resistência e os prejuízos causados pelo controle químico, especialmente seus efeitos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, evidenciam a necessidade do desenvolvimento e adoção de métodos alternativos de controle (SAHEBANI;HADAVI, 2008).

Dentre as diversas metodologias que têm sido testadas com o intuito de melhorar o controle de parasitos, surge o controle biológico. Este método reduz as infecções causadas por helmintos cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (ARAÚJO et al., 2004). Neste sentido, destaca-se o uso de fungos nematófagos presentes no ecossistema e que atuam parasitando ovos e larvas de vida livre dos geohelmintos (BRAGA et al., 2007).

Espécies de *Trichoderma* têm sido empregadas como bionematicidas no controle de fitonematoides, predominantemente do gênero *Meloidogyne* (FERREIRA et al., 2008; SANTIN, 2008). No entanto, este gênero também demonstrou atividade ovicida *in vitro* sobre ovos de *T. canis* (CIARMELA et al., 2002; 2010; MAIA FILHO et al., 2013). Segundo EL GORBAN et al. (2013), os prováveis mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no controle de nematódeos constituí-se no parasitismo direto de ovos e larvas e no incremento da sua atividade enzimática proteolítica e quitinolítica.

A importância do *T. canis* na saúde pública e os problemas inerentes ao controle e prevenção da toxocaríase no homem e animais justificam o desenvolvimento de estudos que minimizem a taxa de infecção deste parasito no ambiente e nas espécies afetadas. Com isso, objetivamos verificar se o tratamento de ovos embrionados de *T. canis* com o fungo nematófago *Trichoderma virens* reduz a infecção pelo parasito quando administrados à camundongos.

2. METODOLOGIA

Isolado fúngico: O isolado fúngico utilizado no presente estudo pertence à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da

UFPel. Trata-se de um isolado autóctone, o qual foi identificado através de suas características morfológicas e moleculares como *Trichoderma virens*.

Obtenção e embrionamento dos ovos de *Toxocara canis*: Os ovos do parasito foram obtidos por histerectomia realizada nas fêmeas de *T. canis*. Após obtenção dos ovos, os mesmos foram armazenados em solução composta de formalina, estreptomicina e cloranfenicol. O embrionamento foi realizado através da incubação da solução de ovos por 30 dias/25°C com aerações diárias.

Interação do fungo com os ovos de *Toxocara canis*: Discos de 4 mm de diâmetro da cultura fúngica foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer contendo 150 mL de meio mínimo. Os frascos foram incubados a 25°C e agitados diariamente por 15 dias. No 15º dia, 5000 ovos de *T. canis* que estavam em processo de embrionamento foram adicionados à cultura fúngica, permanecendo incubados sob as mesmas condições descritas acima por mais 15 dias. Ao final do período de interação, realizou-se centrifugação do meio de cultura (2000 RPM/5 minutos). O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em um mL de solução tampão 0,01M (PBS). Para a contagem dos ovos, 10µL da solução foram analisados entre lâmina e lamínula em objetiva de 40X.

Animais experimentais: Quarenta camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com quatro semanas de vida, cedidas pelo Biotério Central da UFPel foram utilizadas. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em sala climatizada (25°C) com água e comida *ad libitum*. Os animais foram divididos em 2 grupos: Grupo 1 (controle positivo) composto por 20 animais infectados com 0,2 mL de PBS contendo 100 ovos de *T. canis* e grupo 2 (grupo infectado) composto por 20 animais infectados com 0,2 mL de PBS contendo 100 ovos de *T. canis* tratados com o fungo *Trichoderma virens*. Os ovos foram administrados aos camundongos por gavagem.

Quarenta e oito horas após a infecção, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fígado, pulmões e coração foram removidos para posterior recuperação de larvas. Os órgãos foram macerados e digeridos em solução contendo 50 mL de ácido clorídrico 1% e pepsina 1% sob agitação constante a 120 RPM over night a 37°C. Após, os órgãos digeridos foram submetidos a centrifugação a 2000 RPM/5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante de cada órgão foi observado entre lâmina e lamínula em microscopia óptica (40X) para contagem das larvas.

O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas sob o número 678.

Análise estatística: Os dados referentes a contagem das larvas nos órgãos digeridos nos grupos 1 e 2 foram analisados utilizando o teste do qui-quadrado. As análises foram realizadas utilizando o software estatístico SAS (versão 9.4) com nível de significância de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação de larvas nos diferentes órgãos revelou a presença de larvas no coração, pulmões e fígado. O fígado foi o órgão onde houve a contagem mais alta de larvas, tanto no grupo controle positivo (média de 33,8 de larvas recuperadas) quanto no grupo infectado (média de 24,2 larvas recuperadas). Observou-se que os órgãos de animais que receberam os ovos embrionados expostos ao fungo a recuperação média de larvas foi menor ($P < 0,05$) do que aqueles a partir de ovos embrionados sem exposição ao fungo. A taxa de redução de larvas no grupo tratado foi de 57,4%.

Estudos *in vitro* que avaliaram a utilização de fungos nematófagos ovicidas: *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* e *Fusarium pallidoroseum* sugerem que a utilização destes agentes de biocontrole em *T. canis* é uma alternativa viável e

ecológica, uma vez que se constitui numa ferramenta de controle natural (ARAÚJO et al., 1995; CIARMELA et al., 2002; GORTARI et al., 2007; FRASSY et al., 2010; CARVALHO et al., 2010; CIARMELA et al., 2010). Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a viabilidade dos ovos de *T. canis* expostos ao fungo *T. virens* pode ter sido reduzida por duas razões: a) danos à estrutura dos ovos ; b) danos no desenvolvimento da larva. De acordo LYSEK (1978), a atividade ovicida de fungos nematófagos pode ocorrer por destruição das camadas do ovo que faz com que ocorra a exposição do embrião e, consequentemente, a sua morte; ou os fungos podem prejudicar o desenvolvimento do embrião, o que impede a infecção.

O gênero *Trichoderma* é usado como bionematicida no controle de nematoides parasitas de plantas, especialmente o gênero *Meloidogyne* com resultados bem sucedidos, tanto *in vitro* como *in vivo* (FERREIRA et al., 2008; AL-SHAMMARI et al., 2013; MENDOZA et al., 2013). Além disso, sua ação ovicida *in vitro* também foi demonstrada contra *T. canis* (CIARMELA et al. (2002; 2010 ; MAIA FILHO et al. 2013).

EL GORBAN et al. (2013) sugeriram que os prováveis mecanismos utilizados pelo *Trichoderma* no controle de nematoides é constituído pelo parasitismo direto de ovos e larvas e sua ação enzimática proteolítica e quitinolítica.

4. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que a exposição de ovos de *T. canis* com o fungo *T. virens* foi capaz de reduzir a infecção experimental. Dessa forma, este fungo pode ser um potencial agente para o controle biológico de *T. canis* no ambiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHAMMARI, TA, BAHKALI, AH, ELGORBAN, AM, EL-KAHKY, MT, AL-SUM BA. The Use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica* on Tomato. **Journal of Pure and Applied Microbiology**. V.7, p.199-207, 2013.

ARAÚJO, JV, SANTOS, MA, FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47,p. 37– 42, 1995.

ARAÚJO, JV, MOTA, MA, CAMPOS, AK. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13,p.165-169, 2004.

BARRIGA, OO. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. **Veterinary Parasitology**, v.29, p.195-234, 1988.

BRAGA, FR, ARAÚJO, JV, CAMPOS, AK. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 356-358, 2007.

CARVALHO, RO, ARAÚJO, JV, BRAGA, FR, ARAÚJO, JM, ALVES, CD. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.169,p.123–127, 2010.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Toxocara* infection (toxocariasis) and Animals. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/healthypets/diseases/toxocariasis.htm>>, 2013.

CIARMELA, ML, MINVILLE, MC, LORI, G, BASUALDO, JA. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.251–257. 2002.

CIARMELA, ML, ARAMBARRI, AM, BASUALDO, JA, MINVILLE, MC. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal of Microbiology**, v.6, p.75–80, 2010.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.265-272, 2003.

ELGORBAN, AM, ABDEL-WAHAB, MA, BAHKALI, AH, AL-SUM BA. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on Tomato Plants by *Hypocrella lixii* (the Teleomorph of *Trichoderma harzianum*). **Clean – Soil, Air, Water**, v.42, p.1464–1469, 2014.

FERREIRA, PA, FERRAZ, S, LOPES, EA, FREITAS, LG. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Tropical de Ciências Agrárias e Biológicas**, v.2, p.15 – 21, 2008.

FRASSY, LN, BRAGA, FR, SILVA, AR, ARAÚJO, JV, FERREIRA, SR, FREITAS, LG. Destrução de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.102–104, 2010.

GORTARI, C, CAZAU, C, HOURS, R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata. Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.24, p.24–28, 2007.

LYSEK, H. A scanning electron microscope study of the effect of an ovicidal fungus on the eggs of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, v.77, p.139–141, 1978.

MAIA FILHO, FS, VIEIRA, JN, BERNE, MEA, STOLL, FE, NASCENTE, PS, PÖTTER, L, PEREIRA, DIB. Fungal Ovicidal Activity on *Toxocara canis* eggs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.30, p.226-230, 2013.

MENDOZA, GAT, WILSON, JH, COLINA, JC. Efecto de *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratório. **Revista Científica de Estudiantes**, v.1, p. 65, 2013.

SANTIN, RCM. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris***. 2008. 91pp. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.