Gabriela Rodrigues e Fonseca

**Toxocaríase murina experimental: diagnóstico por PCR e comparação
com técnicas imunológicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestra em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek

São Paulo

2018

Gabriela Rodrigues e Fonseca

**Toxocaríase murina experimental: diagnóstico por PCR e comparação
com técnicas imunológicas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestra em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Cesar Borges Gryscek

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Gabriela Rodrigues e
Toxocaríase murina experimental : diagnóstico por
PCR e comparação com técnicas imunológicas /
Gabriela Rodrigues e Fonseca. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Ronaldo Cesar Borges Gryscek.

Descritores: 1.Toxocaríase 2.Toxocara canis
3.Ensaio de imunoadsorção enzimática 4.Western
blotting 5.Camundongos 6.Reação em cadeia da
polimerase

USP/FM/DBD-171/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

DEDICATÓRIA

À minha família e meus
ancestrais, meu eterno amor e
gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Associado Ronaldo César Borges Gryscek, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e constante suporte durante todo o processo; por acreditar no meu potencial e incentivar o meu aprendizado.

À Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano por acreditar em mim desde o início; pela confiança, orientação, paciência, companheirismo, ensinamentos, amizade, apoio e porto seguro em todas as fases do Mestrado. Esse trabalho não seria possível sem você ao meu lado.

À Dra. Fabiana Martins de Paula pela orientação em todas as fases da reação em cadeia da polimerase e auxílio em diversas etapas da dissertação.

À Dra. Fernanda Malta e ao LIM-07, pelo suporte durante a realização da reação em cadeia da polimerase, pela realização do sequenciamento e por ceder os materiais e aparelhagem necessários para a realização dessa técnica.

Ao Dr. Sérgio Vieira dos Santos pela ajuda durante o ELISA, a reação em cadeia da polimerase, análise estatística e durante todo o trabalho, compartilhando seu conhecimento sem vaidade.

À Dra. Dirce Mary Correia Lima Meisel, Guilherme Finochio Sabino e MsC Maiara Gottardi pelo auxílio no *Western-blotting* e compreensão durante todo o processo.

Ao MSc Marcelo Andreetta Corral pelo amor e paciência em compartilhar seu conhecimento sobre *Western-blotting* e ajuda em diversas etapas desse Mestrado; pela amizade sólida e sempre em evolução, e pelo companheirismo durante todo o processo.

Às MsC Géssica Mello e Priscilla Duarte Fonseca, bem como ao Biomédico Rafael Corrêa pela assistência em todas as fases da técnica de biologia molecular.

À MsC Juliana Goldbaum, pela constante amizade e suporte durante o Mestrado.

À Dra. Camila Romano, Dra. Guita Rubinsky-Elefant e Dr. Marcelo Urbano Ferreira pelas sugestões no processo de Qualificação.

À Roseli Antonia Santo e Leticia Claudi, pela assistência do início ao final do Mestrado, conselhos, a amizade e o carinho.

À todas as alunas e alunos, funcionários e funcionárias do LIM-06 e LIM-07 pelo auxílio técnico e companheirismo.

À MsC Laís Calissi Brisolla pela amizade e troca de experiências durante o processo.

Ao LIM-53, especialmente ao Danilo Yamamoto Thomaz, Gabriel Naves Felix e Dra. Monica Vidal, pelo auxílio para a fotodocumentação.

À Cristina Conceição Melo, bem como à equipe de profissionais do Biotério do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pelo auxílio e educação no manejo e ética com animais de experimentação.

Ao Diego de Araujo Toloí. Meu envolvimento com a pesquisa só começou com o seu apoio incondicional e altruísmo.

À Maria Luisa Dib Kawana, por tudo.

Ao Dr. Carlos Alberto Silveira Corrêa, do Departamento de Saúde Coletiva (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas – UNICAMP) pela doação dos vermes adultos de *Toxocara canis* utilizados nesse trabalho.

À CAPES e FAPESP, pelo auxílio à pesquisa.

À minha família, Alice Alayde, Luiz Alberto, Ana Paula e Paulo Sérgio, pelo infinito amor, suporte, paciência, conselhos e encorajamento. Com a sua ajuda, foi possível realizar o Mestrado; com o apoio de vocês, eu aprendi e evolui durante esse processo cheio de novidades, desafios e aprendizados; com o seu amor, mais um desafio na minha vida profissional foi concluído.

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Morfologia e ciclo de Vida	3
2.2 Epidemiologia.....	4
2.3 Resposta imune e imunopatologia	8
2.4 Manifestações clínicas da Toxocaríase	11
2.4.1 <i>Larva Migrans</i> Visceral (LMV).....	11
2.4.2 <i>Larva Migrans</i> Ocular (LMO)	12
2.4.3 Toxocaríase Oculta (TO)	12
2.4.4 Neurotoxocaríase (NT)	13
2.5 Toxocaríase em modelos murinos	13
2.6 Diagnóstico	15
2.6.1 Diagnóstico Anatomopatológico.....	16
2.6.2 Diagnóstico hematológico	16
2.6.2.1 Níveis totais de IgE anti- <i>Toxocara</i>	16
2.6.2.2 Análise citológica de fluidos.....	17
2.6.3 Imunodiagnóstico	17
2.6.3.1 ELISA.....	18
2.6.3.2 <i>Western-blotting</i> (WB).....	21
2.6.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
2.7 Tratamento.....	27
3. JUSTIFICATIVA.....	29
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivos Gerais.....	30

4.2	Objetivos Específicos	30
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	Animais	31
5.1.1	Coleta das amostras	32
5.1.2	Obtenção de larvas e vermes adultos para diagnóstico molecular	32
5.2	Diagnóstico imunológico:	34
5.2.1	ELISA:	34
5.2.2	<i>Western- blotting</i>	36
5.2.2.1	Análise do perfil eletroforético do antígeno	36
5.2.2.2	Imunodeteção de bandas proteicas	36
5.3	Diagnóstico Molecular	38
5.3.1	Extração de DNA das amostras de órgãos de camundongos, larvas e vermes adultos de <i>T. canis</i>	38
5.3.2	Extração de DNA das amostras de soro	39
5.3.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	40
5.3.3	Eletroforese	44
5.3.4	Sequenciamento	44
5.4	Recuperação de larvas	46
5.5	Análise estatística	46
5.6	Comissão de Ética	46
6.	RESULTADOS	47
6.1	ELISA	47
6.2	<i>Western-blotting</i> :	50
6.2.1	Análise do perfil eletroforético	50
6.2.2	Imunodeteção de bandas proteicas	51
6.3	Diagnóstico Molecular	56
6.3.1	Validação	56
6.3.2	Reação em Cadeia da Polimerase em amostras de soro	59
6.3.3	Diagnóstico molecular em amostras de órgãos	64
6.4	Recuperação de larvas	67

7. DISCUSSÃO.....	69
8. CONCLUSÕES.....	80
9. REFERÊNCIAS	81

Apêndices

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	5
Figura 2. Estimativa de soroprevalência e distribuição da infecção ou exposição por <i>T. canis</i>	8
Figura 3. Aparelho de <i>Baermann</i> modificado	34
Figura 4. Padronização do <i>Western-blotting</i> com diferentes diluições de soro positivos de camundongos e conjugado anti-IgG de camundongo.	37
Figura 5. Amplificação de produtos de DNA de verme adulto de <i>T. canis</i> em gradiente de temperatura utilizando o <i>primer</i> Jacobs.	42
Figura 6. Sequência da PCR convencional realizada para todos os <i>primers</i> , em todas as amostras.	43
Figura 7. Sequência realizada nas reações de PCR e eletroforese em amostras de DNA extraído de soro e órgãos, empregando os <i>primers</i> Jacobs, Durant e Universal	43
Figura 8. ELISA IgG para detecção de anticorpos anti- <i>Toxocara</i> utilizando soro de camundongos infectados.	48
Figura 9. ELISA IgG para detecção de anticorpos anti- <i>Toxocara</i> utilizando soro de camundongos infectados.	49
Figura 10. Perfil eletroforético do TES-Ag em SDS-PAGE por coloração de Nitrato de Prata. 1673µg/mL de TES-Ag em 10 µl de tampão de amostra.	50
Figura 11. <i>Western-blotting</i> utilizando soro de camundongos aos 15,30,60, 90 e 120 dpi.....	53
Figura 12. Frequência de bandas reconhecidas por anticorpos IgG contra frações de TES-Ag, nos animais inoculados com 5, 50 e 500 ovos larvados (grupos I, II e III, respectivamente) de acordo com o dia pós infecção	55
Figura 13. Amplificação com diferentes concentrações de DNA de verme adulto de <i>T. canis</i> , empregando o <i>primer</i> Jacobs.	56
Figura 14. Amplificação de DNA utilizando o <i>primer</i> Jacobs (A) e Durant (B).....	57
Figura 15. Amplificação de DNA empregando o <i>primer</i> Jacobs (A) e Durant (B).....	58
Figura 16. Sequenciamento de DNA de verme adulto de <i>T. canis</i> utilizando o <i>primer</i> Jacobs	59
Figura 17. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo I e controle utilizando o <i>primer</i> Jacobs (A) e Durant (B).	61
Figura 18. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo II e controle utilizando os <i>primers</i> Jacobs (A) e Durant (B).....	62
Figura 19. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo III e controle utilizando os <i>primers</i> Jacobs (A) e Durant (B).....	63

Figura 20. Amplificação de DNA de amostras de soro dos grupos I,II,III e controle utilizando o <i>primer</i> Universal.	63
Figura 21. DNA amplificado nas amostras de fígado (A e B), carcaça (C e D) e cérebro (E e F), utilizando os <i>primers</i> Jacobs (A, C e E) e Durant (B, D e F).	65
Figura 22. Positividade da PCR Convencional em amostras de órgãos utilizando o <i>primer</i> Jacobs e Durant.	66
Figura 23. Larvas de <i>T. canis</i> encontradas em fígado, carcaça e cérebro dos camundongos dos grupos infectados.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1. Desenho experimental utilizado nos camundongos para infecção por <i>Toxocara canis</i>	31
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na reação da PCR para detecção DNA nas amostras de soro, larvas e vermes adultos de <i>T. canis</i>	41
Tabela 3. Reagentes, volumes e concentração utilizados na PCR	41
Tabela 4. Reagentes, volume, e concentração para o sequenciamento da amostra de produto amplificado do DNA de verme adulto de <i>T. canis</i>	45
Tabela 5. Frequência de reatividade de anticorpos IgG frente ao TES-Ag em animais durante o curso da infecção.....	54
Tabela 6. Média $\pm$ desvio padrão e percentual de recuperação de larvas nos grupos I, II e III, ao final do experimento.....	67

RESUMO

Fonseca, GR. *Toxocaríase murina experimental: diagnóstico por PCR e comparação com técnicas imunológicas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A toxocaríase é considerada uma das cinco parasitoses negligenciadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* e recebe ainda pouca atenção. As metodologias diagnósticas conhecidas são bem estabelecidas, apresentando, porém, limitações caracterizadas, sobretudo, pela ocorrência de reações-cruzadas. A biologia molecular mostra grandes avanços para o diagnóstico eficaz de diversas parasitoses, mas ainda carece de estudos em amostras de fácil obtenção para o diagnóstico da toxocaríase. Para aprimorar o conhecimento sobre a importância da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Convencional (PCR) e sua relação com técnicas diagnósticas já conhecidas, foram utilizados 42 camundongos BALB/c, machos, entre 6 a 8 semanas de vida, divididos em três grupos, inoculados com 5, 50 ou 500 ovos larvados e sangrados pelo plexo orbital aos 15, 30, 60 e 90 dias pós infecção. Ainda, do total, 24 camundongos foram sangrados aos 120 dias pós infecção. Ao final do experimento, foi realizada a recuperação de larvas e a PCR de tecido hepático, cérebro e carcaça de camundongos dos grupos infectados. As amostras de soro foram processadas pelas técnicas de ELISA, *Western-blotting* e PCR. O ELISA e o *Western-blotting* mostraram resultados reagentes em todas as datas para a maioria dos inóculos de ovos, com relação diretamente proporcional entre a detecção de anticorpos e a carga parasitária. Durante o período da infecção, a detecção de IgG foi mais intensa próxima aos 60 dias pós-infecção para a maioria dos inóculos de ovos, por ambos os métodos imunológicos. Apesar de identificar DNA de larvas e vermes adultos, a PCR não foi capaz de detectar DNA do parasito em amostras de soro em todos os grupos e datas pós-infecção. Em contrapartida, foi detectado DNA do parasito em todos os órgãos com ao menos um dos *primers* utilizados. Foram recuperadas larvas na maioria dos órgãos com maior porcentagem de recuperação relatada nos animais inoculados com 50 ovos larvados. O diagnóstico molecular, utilizando sangue do paciente, ainda não pode ser considerado uma ferramenta para o diagnóstico dessa infecção.

Descritores: toxocaríase; *Toxocara canis*; ensaio de imunoadsorção enzimática; *western blotting*; camundongos; PCR.

ABSTRACT

Fonseca, GR. *Experimental murine toxocariasis: PCR diagnosis and its comparison with immunological techniques* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo": 2018.

Toxocariasis is considered by the *Centers for Disease Control and Prevention* one of the five neglected diseases and still receives little attention. The diagnostic methods are well established, presenting, however, limitations characterized mainly by the occurrence of cross-reactions. Molecular biology shows great advance for the effective diagnosis of several parasitic infections, but still lacks studies using samples that are easily obtained for the diagnosis of toxocariasis. In order to refine the knowledge about the importance of Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and its relation with known techniques, 42 BALB/c male mice, between 6-8 weeks of age were inoculated with 5, 50 and 500 embryonated eggs respectively and bled by the orbital plexus at 15, 30, 60 and 90 days post infection. Also, 24 of 42 animals were bled the same way at 120 days post-infection. At the end of the experiment, larval recovery and conventional PCR were performed in liver, brain and carcass of mice of the infected groups. Serum samples were processed by ELISA, *Western-blotting* and PCR. The ELISA and *Western-blotting* techniques showed positive results in all days post infection for most eggs inocula and showed a directly proportional dependence between the infective dose and the level of antibodies. During the course of the infection, IgG detection was most intense near 60 days post infection for most eggs inocula, for both diagnostic methods. Despite positive DNA identification in larvae and adult worms, PCR wasn't able to detect parasite DNA in serum samples in all infected groups and days post infection. In contrast, parasite DNA was detected in all organs with at least one of the *primers*. Larvae were recovered from most organs, and animals inoculated with 50 embryonated eggs showed the highest percentage of larval recovery. Molecular diagnosis using patient's blood is not the best tool for toxocariasis diagnosis so far.

Descriptors: toxocariasis; *Toxocara canis*; enzyme-linked immunosorbent assay; blotting, western; balb c; polymerase chain reaction.

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose causada pelo nematódeo *Toxocara* spp e pode ocasionar diversos quadros, como a *Larva Migrans* Visceral, *Larva Migrans* Ocular, Toxocaríase Oculta ou Comum, e Neurotoxocaríase (Chieffi et al., 2009a; Fillaux e Magnaval, 2013; Macpherson, 2013; Overgaauw e Van Knapen, 2013).

O primeiro caso da ocorrência da larva de *Toxocara* spp. fora do seu hospedeiro definitivo foi relatado por Ransom e Foster em 1920. Em 1952, Beaver et al. observaram a larva de *Toxocara canis* em granulomas eosinofílicos em biópsias de crianças, denominando essa síndrome de *Larva migrans* visceral, definindo também o homem como um dos hospedeiros paratênicos. Em 1950, Wilder relatou o achado de nematódeos em olhos enucleados após o diagnóstico presuntivo de retinoblastoma. Em 1956, Nichols, após cuidadoso estudo morfológico, identificou a larva como *T. canis*, descrevendo o quadro de *Larva migrans* ocular. Cerca de três décadas depois, foi descrita a Toxocaríase Oculta, caracterizada por sinais e sintomas inespecíficos em adultos e crianças, eosinofilia às vezes ausente e presença de anticorpos anti-*Toxocara* (Glickman et al. 1987; Taylor et al. 1987).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O termo toxocaríase é aplicado a infecções por parasitos do gênero *Toxocara*, em especial as espécies *T. canis* e *T. cati* no hospedeiro paratênico, particularmente no homem. Esse ascarídeo pertence à Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaridioidea e família Toxocaridae (Despommier, 2003).

Sendo a toxocaríase uma zoonose, o parasito pode infectar dois tipos de hospedeiros: o definitivo, com destaque para canídeos (*T. canis*) e felídeos (*T. cati*), e o paratênico, onde permanece no estágio larvário em roedores, alguns invertebrados e mamíferos, especialmente o homem (Macpherson, 2013).

Cães e gatos são as maiores e mais estudadas fontes de transmissão de ovos de *Toxocara* em hospedeiros definitivos, porém, alguns roedores urbanos e animais selvagens, especialmente raposas na Europa, podem ser reservatórios do parasito, mantendo seu ciclo de vida e a transmissão para hospedeiros paratênicos (Macpherson 2013; Overgaauw e van Knapen, 2013). Alguns estágios evolutivos de *T. canis* e *T. cati* podem infectar os hospedeiros definitivos utilizando diversas rotas: as larvas via transplacentária (exceto *T. cati*) e/ou transmamária, ou ao preda um hospedeiro paratênico infectado; e os ovos via horizontal, ingerindo-os a partir do solo (Macpherson, 2013). Filhotes podem se infectar já *in utero* pela reativação de larvas somáticas nos tecidos da mãe, resultando em filhotes infectados e excretando ovos pelas fezes aproximadamente duas semanas após o parto (Lloyd et al., 1983; Macpherson, 2013). A transmissão transmamária é mais rara, mas também ocorre por até cinco semanas após o nascimento dos filhotes (Overgaauw e Van Knapen, 2013).

Em hospedeiros paratênicos como ratos, camundongos, hamsters, coelhos e humanos, a transmissão ocorre por geofagia, ingestão de vegetais contaminados com ovos embrionados ou ainda ingerindo a carne ou vísceras infectadas de outros hospedeiros (Choi et al. 2012; Macpherson, 2013; Fellrath e Magnaval, 2014). A transmissão de ovos embrionados por meio dos pelos de animais é também discutida como uma rota de transmissão dessa zoonose. Enquanto alguns autores a consideram importante, outros discordam, já que os

ovos são muito adesivos, dificultando sua remoção e a ingestão acidental dos mesmos; adicionalmente, são poucos os ovos embrionados presentes nos pelos, havendo, por isso, necessidade da ingestão de uma grande quantidade para que se constitua num verdadeiro fator de risco (Overgaauw et al., 2009).

2.1 Morfologia e ciclo de Vida

Os ovos do gênero *Toxocara* são subesféricos, com casca espessa e mamilonada, e o seu tamanho mostra pouca diferença entre as principais espécies, medindo entre 80 a 85 µm em *T. canis* e 65-75 µm no caso de *T. cati*. O verme adulto é cilíndrico, apresenta três lábios e asa cervical estriada. Os machos medem cerca de 4-6 cm e as fêmeas, de 6-10 cm (CDC, 2013).

As larvas passam por quatro estádios, sendo o terceiro estágio infectante para ambos os tipos de hospedeiros. De forma geral, medem aproximadamente 500 µm de comprimento por 18-20 µm de largura e apresentam vestíbulo bucal com três lábios (Schacher, 1957; CDC, 2013). O esôfago ocupa menos de 1/3 de seu comprimento e a região intestinal é coberta por glóbulos refratários que tomam quase todo o comprimento da larva (Nichols, 1956).

Fêmeas do gênero *Toxocara* eliminam até 200.000 ovos por dia para o ambiente pelo trato digestivo do hospedeiro definitivo, especialmente filhotes (Glickman & Schantz, 1981; Macpherson, 2013). Em condições favoráveis, com temperaturas entre 10 a 30°C, tipo de solo e umidade, os ovos precisam de até seis semanas para completar o seu ciclo no solo e tornarem-se embrionados, contendo larvas infectantes em seu terceiro estágio (L₃) (Macpherson 2013; Overgaauw e Van Knapen 2013). O hospedeiro definitivo, além da infecção transplacentária ou transmamária, pode ingerir os ovos embrionados a partir do meio ambiente; após serem liberadas dos ovos, as larvas infectantes atravessam a parede intestinal. As larvas migram para os pulmões, árvore brônquica e esôfago, até se desenvolverem em vermes adultos no intestino delgado após 60 a 90 dias; esta é a denominada migração traqueal (Despommier, 2003; Chieffi et al. 2009a; CDC, 2013). Essa rota é mais comum em filhotes, mas também ocorre em adultos (CDC, 2013). A larva presente nos tecidos do hospedeiro paratênico,

quando predado por um hospedeiro definitivo, é liberada durante a digestão dos tecidos e assim, completa o seu ciclo (Glickman & Schantz, 1981). Canídeos e felídeos também podem desenvolver infecção semelhante à dos hospedeiros paratênicos, ou migração somática, principalmente cães adultos que já foram infectados pelo parasito anteriormente (Chieffi et al. 2009a). Nesses animais, seja pela ingestão de ovos embrionados ou predando um hospedeiro paratênico infectado, a larva atravessa a parede intestinal, migrando pela corrente sanguínea para fígado, pulmões e coração e é disseminada para a circulação sistêmica. Em algum momento, as larvas atravessam os vasos capilares e migram pelos tecidos, permanecendo encistadas ou não, mas normalmente viáveis por um longo período (Magnaval et al. 2001). Em hospedeiros paratênicos, independentemente da ingestão de ovos embrionados ou de larvas encistadas nas carnes e vísceras de outros hospedeiros paratênicos, as larvas penetram a parede intestinal e migram pela circulação para os diversos órgãos (CDC, 2013) (Figura 1).

2.2 Epidemiologia

Nos Estados Unidos da América, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) considerou a toxocaríase como uma das cinco doenças negligenciadas baseado no número de pessoas infectadas, a severidade da doença e na falta de tratamento e prevenção. A toxocaríase e as outras quatro doenças categorizadas como negligenciadas são assim denominadas devido à falta de atenção dada a elas quanto a sua prevenção, vigilância e/ou tratamento (CDC, 2016).

São muitos os aspectos envolvidos na epidemiologia dessa doença, incluindo fatores ambientais. Os ovos de *Toxocara* spp. sobrevivem por anos no meio ambiente, com desenvolvimento acelerado em climas quentes e retardado em climas temperados, garantindo a sua sobrevivência durante todo o ano em

países de clima tropical e de forma sazonal em países de clima temperado (Azam et al. 2012).

Figura 1. Ciclo de vida de *Toxocara canis*. Fonte: Adaptado de Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern, *Centers for Disease Control and Prevention*

Os hospedeiros definitivos também são fonte importante de transmissão da doença. A transmissão transplacentária e transmamária assegura que o ciclo de vida será completo, com grande número de ovos no ambiente, contaminando áreas públicas com maior concentração de pessoas, permitindo, assim, a transmissão à uma grande quantidade de hospedeiros definitivos e paratênicos (Magnaval et al. 2001; Despommier, 2003; Macpherson, 2013; Chieffi et al. 2009a; Overgaauw e Van Knapen, 2013). Na Grã-Bretanha, relatou-se que animais selvagens podem se tornar a maior fonte de contaminação ambiental

quando se eliminam cachorros infectados como a principal fonte, mantendo o ciclo da toxocaríase (Morgan et al. 2013). Ainda, um estudo de abrangência nacional realizado nos Estados Unidos da América mostrou um grande aumento no número de cães e gatos de 2011 a 2014, aumentando o potencial de contaminação do solo por esses animais, enfatizando a importância dos hospedeiros definitivos na transmissão da zoonose para humanos (Farmer et al. 2017).

Ovos de *Toxocara* foram detectados no solo em áreas de recreação no Brasil, Portugal, Grã-Bretanha, Irã e Chile, com maior ou menor prevalência, mas todos com potencial de transmissão para humanos e hospedeiros paratênicos (Capuano e Rocha, 2005; Cassenote et al. 2011; Gallina et al. 2011; Morgan et al. 2013; Luzio et al. 2015; Otero et al. 2017; Maleki et al. 2017). Katagiri e Oliveira-Sequeira (2008) demonstraram que os responsáveis por cães infectados com *T. canis* e outras zoonoses não apresentavam conhecimento prévio sobre o parasito, as principais vias de transmissão, os fatores de risco e medidas profiláticas, mostrando como este desconhecimento afeta não só animais, mas seres humanos, direta e indiretamente.

Crianças são as mais susceptíveis à parasitose. O contato próximo com animais, a falta de higiene após o manuseio do solo, seu comportamento de levar a mão à boca e até ingerir o solo contaminado justifica o grande número de casos nessa faixa etária (Macpherson, 2013; Overgaauw e Van Knapen, 2013). Além da ingestão de ovos, adultos adquirem a infecção mais comumente via ingestão de hospedeiros paratênicos infectados (Choi et al. 2012). Pesquisadores brasileiros observaram que as condições ambientais do país permitiam a manutenção da doença tanto em humanos quanto em hospedeiros definitivos, pela grande população de cães infectados e solo frequentemente contaminados com ovos. Em seguida, relatos de casos sobre a toxocaríase humana surgiram, consolidados pela publicação de diversos artigos científicos (Chieffi et al. 2009a).

Em humanos, inquéritos soroepidemiológicos apontam prevalências díspares entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, variando de 0,7% na Nova Zelândia, 1,6% no Japão, 2,4% na Dinamarca e 5,1% nos Estados Unidos da América a 44,6% na Suazilândia, 22% no Irã e 81% no Nepal. Ainda

são poucos os estudos com uma população bem definida para se predizer a real prevalência mundial da doença, como observado na figura 2 (Liao et al. 2010; Fan et al. 2013; Farmer et al. 2017; Ma et al. 2017). No Brasil, a soroprevalência na população infantil da cidade de São Paulo foi estimada em 54,8% (Figueiredo et al. 2005); em Salvador, em crianças vivendo em áreas pobres, a soroprevalência foi de 48%, e no Espírito Santo, de 51,6% (Fragoso et al. 2011; Mendonça et al. 2013). Em adultos, na cidade de Presidente Prudente, a soroprevalência em candidatos a doação de sangue foi de 8,7% (Negri et al. 2013). A toxocaríase atinge populações vulneráveis e de alto risco, nas quais a prevalência difere. Em uma comunidade andina, 20,46% dos pacientes foram reagentes para o ELISA (Espinoza et al. 2010); em uma população com suspeita de alergia, 27,5% foram reagentes para os testes imunodiagnósticos (Qualizza et al. 2011); no México, pacientes psiquiátricos, pessoas que vivem de coleta de materiais recicláveis em condições precárias e crianças apresentaram soroprevalência de 4,7% (Lee et al. 2014).

Os estudos soroepidemiológicos geralmente utilizam diferentes valores de *cut-off* e, com a dificuldade de relacionar os títulos, infecção e manifestações clínicas, os reais aspectos epidemiológicos da toxocaríase permanecem obscuros (Smith et al. 2009). Assim, a toxocaríase exemplifica como a falta de integração de profissionais de diversas áreas contribui para a persistência da zoonose a nível mundial, bem como a necessidade de pesquisas melhor elaboradas para esclarecer perguntas ainda não respondidas sobre a epidemiologia dessa doença (Holland, 2015).

Figura 2. Estimativa de soroprevalência e distribuição da infecção ou exposição por *T. canis*. Os círculos amarelos com contorno azul são baseados em estudos bem definidos ou meta-análises. Fonte: traduzido de Ma, G et al. Human Toxocariasis. 2017, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)

2.3 Resposta imune e imunopatologia

Helmintos, à diferença de bactérias, vírus e fungos, não se replicam na célula do hospedeiro. Cada forma infectante que penetra no hospedeiro deve evoluir ao estágio adulto, para continuar o ciclo seja pela liberação de ovos ou outras formas evolutivas. Esses aspectos, entre outros, desencadeiam no hospedeiro uma resposta do tipo T_H2 , envolvendo as citocinas Interleucina 4 (IL-4), que promove a diferenciação de células B e síntese de IgE; IL-5, que estimula a diferenciação de eosinófilos, células importantes na infecção por *Toxocara* spp.; IL-10 e IL-13, responsáveis pela modulação negativa da resposta do tipo T_H1 , além de mastócitos, macrófagos ativados e anticorpos IgG. Os anticorpos são particularmente importantes nos estágios extraintestinais da infecção por

helmintos, inclusive quando estes estão encistados (Maizels, 2013; Allen e Maizels, 2011; Maizels et al., 2006).

A larva infectante de *Toxocara canis* libera quantidades significativas de antígenos glicoproteicos solúveis, ou antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* (TES-Ag). Parte desse antígeno tem origem interna, secretado pela glândula esofagiana da larva, e a outra faz parte da epicutícula, composta por glicoproteínas (Fillaux e Magnaval, 2013). Após o relato de De Savigny (1975) quanto a longevidade da larva de *T. canis* em meio de cultura específico, iniciou-se uma série de relatos e experimentos de caracterização dos TES-Ag, sendo os mais importantes o TES-26, TES-32, TES-70 e TES-120 (Maizels et al. 1984) entre outras proteínas com potencial diagnóstico relatadas recentemente com o avanço da proteômica (Sperotto et al, 2017).

O antígeno de excreção-secreção de 26 kDa foi descrito por Krause e Hirsh (1987) em *Caenorhabditis elegans* e é homólogo a proteína de mamíferos, de nome TES-26 para antígenos de *Toxocara*, posteriormente renomeada Tc-PEB-1 (Gems et al. 1995). Está presente nas proteínas de *Toxocara* spp. e outros nematódeos, mas não se sabe qual a sua função exata nesses parasitos (Maizels, 2013).

O TES-32 é a proteína mais encontrada na superfície do parasito, expressa especificamente em sua cutícula (Maizels et al. 2000). Esta é uma Lecitina do tipo C (LTC) e assim, foi renomeada de Tc-CTL-1, apresentando-se homóloga a proteínas de mamíferos, especialmente às presentes em células de defesa, participando na evasão do sistema imune e com importância no imunodiagnóstico (Loukas et al. 1999a). O Tc-CTL-1 parece ser uma proteína bem conservada no gênero *Toxocara*, pois apresenta reação-cruzada com diferentes espécies. Outras sequências com pequenas variações nos aminoácidos foram nomeadas Tc-CTL-2 e Tc-CTL-3. Juntamente a estas lecitinas, o então TES-70, agora renomado Tc-CTL-4, mostrou ligar-se à células caninas *in vitro*, mas seu respectivo ligante em outros mamíferos necessita ainda ser determinado (Maizels, 2013). Finalmente, o TES-120, outro antígeno abundantemente encontrado na superfície da larva, é composto de mucinas, e estão associadas ao glicocálix da superfície larvária. Na larva de *T. canis*,

destacam-se as mucinas 1 a 5 (MUC-1 a MUC-5), que compõem a superfície larvária (Page et al. 1992; Gems et al. 1996; Loukas et al. 2000; Doedens et al. 2001; Maizels, 2013). Em 2015, Zhu et al., por meio de um estudo internacional de genoma, transcriptoma e secretoma, descreveram 870 proteínas de excreção-secreção e entre elas, 17 lecitinas.

Esses componentes, entre outros que foram recentemente relatados, estão envolvidos no complexo e múltiplo mecanismo de evasão e modulação da larva à resposta imune (Zhu et al. 2015). A larva de *Toxocara* migra pelos tecidos do hospedeiro sem causar inflamação intensa no sítio, mostrando que desenvolveu mecanismos eficientes para evadir da resposta imune de hospedeiros definitivos e paratênicos. Na presença de anticorpos específicos, os eosinófilos se ligam à superfície da larva, mas após pouco tempo, a mesma segue livre, enquanto os eosinófilos e anticorpos continuam ligados à superfície recém-liberada. As larvas produzem aproximadamente 2ng/larva/dia de TES-Ag, que é liberado e renovado rapidamente (Maizels, 2013; Fillaux e Magnaval, 2013; Maizels et al. 2006). A larva de *Toxocara* estimula uma resposta imune mista (ou seja, com presença de T_H1 e T_H2), com predominância do tipo T_H2 em mamíferos, associada com a produção de anticorpos anti-*Toxocara* e modulação da resposta de macrófagos (Fan et al. 2013; Maizels, 2013; Maizels et al. 2006). Não se conhecem ainda os mecanismos que a larva utiliza para modular a resposta imune, porém estudos recentes mostram que o parasito induz a secreção de Fator de Transformação de Crescimento Beta ($TGF-\beta$), ativando células T reguladoras (Fan et al. 2013).

Ao migrar pela matriz extracelular dos tecidos, o TES-Ag liberado estimula mediadores como o Fator de Necrose Tumoral alfa ($TNF-\alpha$) e IL-8, que se difundem pela matriz extracelular. A IL-8 é mediadora de neutrófilos, que são as primeiras células a contribuir para o infiltrado inflamatório que se formará ao redor da larva. Posteriormente, esse infiltrado será substituído por eosinófilos, atraídos pelas citocinas secretadas pela resposta T_H2 , especialmente IL-5, responsável pela conversão de um infiltrado rico em neutrófilos para um com predominância de eosinófilos. Essas células não conseguem controlar a infecção pelo parasito, em parte pela constante liberação do revestimento da larva, onde

os eosinófilos ficam ligados, e parte porque os eosinófilos expressam receptores somente para a porção Fc em agregados de IgG e não para IgG e IgE, como observado em pesquisas com animais de experimentação. Deve-se salientar que há diferenças no comportamento de eosinófilos de animais de experimentação, como camundongos, e o de seres humanos, já que nos primeiros observa-se que eosinófilos não degranulam em resposta aos ligantes de células T e nem expressam receptores de baixa afinidade de IgE. Dessa maneira, ainda que os eosinófilos sejam importantes na infecção por *T. canis* em animais e humanos, fato marcado por vezes pela presença de eosinofilia, estes não são sempre suficientes para controlar ou eliminar a larva e evitar a infecção pelo parasito. (Maizels et al. 2006).

2.4 Manifestações clínicas da Toxocaríase

As manifestações clínicas da doença são causadas pela migração da L₃ pela corrente sanguínea para diversos órgãos, incluindo músculo, cérebro, fígado e olhos. Os indivíduos infectados podem se apresentar assintomáticos ou com uma diversidade de sintomas, geralmente inespecíficos, que irão depender da imunidade do hospedeiro, do inóculo, da duração e intensidade da infecção (Macpherson, 2013).

2.4.1 Larva Migrans Visceral (LMV)

Beaver et al. (1952) descreveram pela primeira vez a síndrome da LMV com achados de larvas de *T. canis* em biópsia de fígado em crianças, encapsulados em granulomas eosinofílicos. Normalmente, essa síndrome afeta crianças de até 10 anos, mas também é comum em adultos, e está relacionada a inóculo importante ou a infecções repetidas (Macpherson, 2013). Em animais, foram observados focos de hemorragia nos rins e pulmões (Strube et al. 2013). Ademais, granulomas ricos em eosinófilos também foram observados em biópsias de musculatura e miocárdio de camundongos (Kayes e Oaks, 1978; Cookston et al. 1990).

Geralmente, os aspectos clínicos associados à LMV em humanos incluem perda de peso, hepatoesplenomegalia, febre, tosse e sintomas relacionados a asma, fadiga, vômitos e diarreia (Fan et al. 2013; Macpherson, 2013; Fillaux e Magnaval, 2013; Despommier, 2003; Magnaval et al. 2001).

2.4.2 Larva Migrans Ocular (LMO)

A LMO ocorre em crianças mais velhas e jovens adultos e, geralmente, é unilateral (Iddawela et al. 2017; Fillaux e Magnaval, 2013; Despommier, 2003; Magnaval et al. 2001). Esta síndrome pode ser resultado de uma infecção por um inóculo pequeno de larvas, causada pela migração da larva infectante para o olho e consequente resposta imune, o que revelará uma variedade de sintomas (Macpherson, 2013). As principais manifestações clínicas são a perda temporária da visão nas primeiras semanas, estrabismo, leucocoria, granuloma periférico e de pólo posterior, vitrite, uveíte anterior ou posterior e coriorretinite (Iddawela et al. 2017; Tian and O'Hagan, 2015; Fillaux e Magnaval, 2013; Macpherson, 2013; Rubinsky-Elefant et al. 2010; Despommier, 2003; Magnaval et al. 2001).

Em camundongos, são frequentemente observadas hemorragias, vasculites retinianas e uveítes (Strube et al. 2013).

2.4.3 Toxocaríase Oculta (TO)

A alta soroprevalência de pacientes com toxocaríase *versus* o baixo índice de LMV noticiado globalmente estimulou pesquisadores a procurarem outras formas da doença. Nos anos 80, Taylor et al. (1987) e Glickman et al. (1987) demonstraram que a toxocaríase era uma doença comum, com sintomas inespecíficos em crianças como distúrbios do sono e de comportamento, anorexia, febre, hepatomegalia, tosse, náuseas, dores abdominais e de cabeça, fraqueza, e, em adultos, dor abdominal, sinais e sintomas respiratórios e sintomas alérgicos como prurido e *rash*, ou são assintomáticos. Assim,

descreveu-se a síndrome da toxocaríase oculta ou *covert* (em crianças) e comum ou *common* (em adultos). Além desses sintomas, alguns pacientes podem ou não apresentar eosinofilia (Fillaux e Magnaval, 2013; Magnaval et al. 2001).

2.4.4 Neurotoxocaríase (NT)

A NT é causada pela migração da larva de *Toxocara* spp. para o Sistema Nervoso Central (SNC) e influenciada por múltiplos fatores, incluindo a genética do hospedeiro infectado, o inóculo e exposição prévia ao parasito, que tem como sítios mais comuns de infecção a medula espinal e cérebro (Fan et al. 2015). Essa síndrome foi descrita pela primeira vez por Beautyman e Woolf (1951) e após 30 anos, cresceram o número de relatos de NT no mundo devido ao aprimoramento das técnicas diagnósticas (Fan et al. 2015). A infecção do SNC pela larva de *Toxocara* pode causar doenças inespecíficas, incluindo meningoencefalite, mielite, meningite, além de déficits neuropsicológicos e associação com epilepsia, que ainda é controversa (Colebunders et al. 2016; Fan et al. 2015; Macpherson, 2013; Fillaux e Magnaval, 2013; Zibaei et al. 2013a; Quattrocchi et al. 2012). Em camundongos, foram observados sintomas como apatia, sonolência, cifose e tremores (Epe et al. 1994).

2.5 Toxocaríase em modelos murinos

Modelos murinos são utilizados extensivamente para o estudo da toxocaríase (Pinelli et al. 2006). De forma geral, a larva, após ser liberada do ovo, inicia a sua fase visceral ou hepato-pulmonar, migrando para fígado e pulmões nos primeiros dias após infecção. Depois, a larva migra pela circulação e atinge diversos órgãos, dependendo da espécie, iniciando a fase miotrópica-neurotrópica, como descrito por Abo-Shehada e Herbert (1984). Espécies de *Toxocara* têm predileção por alguns órgãos, o que não significa que as larvas não migrem para qualquer órgão. *T. canis* tem predileção pelo SNC na fase miotrópica-neurotrópica e a espécie *T. cati*, apesar do padrão migratório similar,

tem mais afinidade pelos músculos desses animais (Strube et al. 2013). Mesmo com um padrão migratório bem descrito e comprovado por diversos estudos nos últimos 30 anos, a larva também tem um padrão de migração contínua, relatado na década de 90 por Cookston et al. (1990) e, recentemente, por Othman et al. (2011), que observaram granulomas recentes e antigos no coração e fígado, respectivamente.

Os modelos murinos são utilizados como fonte confiável para a comparação com a doença em humanos, mas apesar das semelhanças, não se deve desconsiderar as diferenças entre as espécies. A escolha do animal a ser utilizado depende do foco de cada estudo, pois cada linhagem apresenta diferenças, uma vez que alguns animais têm um órgão em particular mais afetado que outros, maior ou menor susceptibilidade e taxa de sobrevivência. Um exemplo marcante são animais isogênicos e heterogênicos, que apresentam diferenças na migração larvária, observadas nas diferentes linhagens estudadas (Cox e Holland, 2001). Epe et al. (1994) estudaram as linhagens BALB/c, C3H, C57Bl, DBA e NMRI e notaram que da linhagem BALB/c foram recuperados a maior quantidade de larvas no cérebro e ainda, poucos animais apresentaram sintomas neurológicos, ao contrário das outras linhagens. Também, um número crescente de animais das linhagens C3H, C57Bl, DBA e NMRI morreram entre os dias 17 e 21 após infecção, ao contrário dos animais da linhagem BALB/c, que mostraram menor morbidade e mortalidade. Já no estudo de Bardón et al. (1994), as larvas de *T. canis* foram recuperadas até um ano após infecção em camundongos BALB/c. Por sua enorme susceptibilidade à infecção pelo parasito, os camundongos da linhagem BALB/c são os mais utilizados até o momento para o estudo da toxocaríase (Strube et al. 2013).

Mesmo com essas vantagens, camundongos não apresentaram bons resultados ao estudar particularmente a síndrome da LMO. Comparado com camundongos, a incidência dessa síndrome em gerbilos é até 90% mais alta, com presença de larvas e granulomas (Alba-Hurtado et al. 2000). O padrão de migração larvária também difere dos camundongos, dado que as larvas durante a fase visceral estão em maior quantidade nos pulmões, enquanto em camundongos encontram-se no fígado, e também tem menor afinidade pelo

tecido muscular. Gerbilos também apresentam sintomas neurológicos correlacionados com o sítio de migração larvária, apresentando edema de pálpebra e falta de coordenação como principais sintomas (Alba-Hurtado et al. 2009).

De modo similar aos camundongos, ratos são utilizados para a pesquisa da toxocaríase, embora não com a mesma frequência (Strube et al. 2013). A migração larvária apresenta padrão similar ao observado em camundongos, seguindo a mesma fase visceral e miotrópica-neurotrópica (Lescano et al. 2004). Estudos com ratos que analisaram a mudança de comportamento do animal frente à infecção por *Toxocara* spp. observaram que esta pode ser uma faceta utilizada pelo parasito para que o animal fique susceptível à predação pelo hospedeiro definitivo e assim, possa completar o seu ciclo de vida (Strube et al. 2013). O aumento no comportamento exploratório de ratos infectados com alta carga parasitária e a deterioração muscular aumentam as chances da transmissão da larva de *Toxocara* spp. pela predação desse animal (Strube et al. 2013; Chieffi et al. 2010; Chieffi et al. 2009b).

Outros hospedeiros paratênicos como hamsters, porcos e aves também auxiliam no estudo de diversos aspectos dessa zoonose (Silva et al. 2015; Strube et al. 2013).

2.6 Diagnóstico

Para o diagnóstico da toxocaríase, devem ser considerados aspectos clínicos, o histórico do paciente e epidemiologia da doença, incluindo geofagia e contato com animais. Dado que os sintomas são inespecíficos, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com outras parasitoses e doenças que também cursem com hipereosinofilia tais como asma, reações alérgicas, leucemias e outras parasitoses como filariose e esquistossomose (Chieffi et al. 2009a).

2.6.1 Diagnóstico Anatomopatológico

O diagnóstico definitivo da toxocaríase pode ser realizado por testes histopatológicos e morfométricos da larva de *Toxocara* spp. em biópsias de órgãos afetados pelo parasito. Técnicas imunohistoquímicas permitem identificar o TES-Ag nas secções histológicas examinadas, entretanto, a dificuldade de se obter material para processar por este método, especialmente aquele que contenha a larva, compromete a viabilidade do mesmo (Fillaux e Magnaval, 2013; Chieffi et al. 2009a; Smith e Noordin, 2006). Ademais, a biópsia é um método invasivo, para uma doença de curso frequentemente benigno, tornando-se desnecessária e difícil de justificar sob o ponto de vista ético (Fillaux e Magnaval, 2013).

2.6.2 Diagnóstico hematológico

A eosinofilia é marcadamente presente na maioria dos pacientes com LMV e na TO a eosinofilia pode ou não estar presente (Fillaux e Magnaval, 2013; Chieffi et al. 2009a; Lassmann et al. 2007; Magnaval et al. 2001). Na LMO, provavelmente devido à baixa carga parasitária, os níveis de eosinófilos são normais, exceto em casos onde há infecção generalizada e acometimento dos olhos de forma concomitante (Fillaux e Magnaval, 2013). Pacientes com NT, em particular aqueles com meningoencefalite eosinofílica, meningite e encefalite, também podem apresentar eosinofilia (Fan et al. 2015).

2.6.2.1 Níveis totais de IgE anti-*Toxocara*

Os níveis de IgE total são especialmente importantes em pacientes com a forma oculta da doença, ou que podem não apresentar eosinofilia no sangue associada a manifestações clínicas, já que nestes pacientes os níveis de IgE totais podem estar elevados, as vezes acima de 500 UI/mL (Fillaux e Magnaval,

2013; Watthanakulpanich, 2010; Magnaval et al. 2001). Elefant et al. (2006) demonstraram um teste ELISA para IgE com 78,3% de sensibilidade e o apontam, juntamente com a contagem de eosinófilos, como potencial marcador sorológico em pacientes com diversas síndromes da toxocaríase após tratamento.

2.6.2.2 Análise citológica de fluidos

No líquido cefalorraquidiano (LCR), a presença de pleocitose com eosinofilia é sugestiva de NT, que também foi observada no humor vítreo ou aquoso nos casos de LMO, porém, a exiguidade das amostras dificulta a utilização desta técnica (Fillaux e Magnaval, 2013).

2.6.3 Imunodiagnóstico

O estudo utilizando o imunodiagnóstico foi impulsionado quando pesquisadores observaram as dificuldades do exame direto, como o histológico (Fillaux e Magnaval, 2013). Dos anos 50 à década de 70, testes sorológicos como hemaglutinação, difusão em ágar e imunoeletroforese utilizaram antígenos de vermes adultos e ovos, e apesar da constante evolução, ainda apresentavam baixa sensibilidade e especificidade e mostraram-se laboriosos, além de falhar na detecção de infecções com baixa carga parasitária (Kagan, 1957; Kagan et al. 1958; Fillaux e Magnaval, 2013). Em 1975, De Savigny apresentou um novo método para produzir TES-Ag a partir da manutenção de larvas infectantes em meio de cultura, e poucos anos depois, demonstrou a utilidade do mesmo em teste ELISA, culminando no método mais utilizado atualmente, com ou sem modificações (De Savigny et al. 1979). Atualmente, ainda que em poucos relatos, outras técnicas imunodiagnósticas foram empregadas para o diagnóstico da toxocaríase (Anderson et al. 2015). Os resultados promissores ressaltam os esforços realizados e as oportunidades que o imunodiagnóstico ainda provém para novas e melhores técnicas.

2.6.3.1 ELISA

O teste ELISA utilizando o TES-Ag para a detecção de anticorpos IgG é atualmente o método sorológico mais utilizado para o diagnóstico da toxocaríase (Fillaux e Magnaval, 2013; Magnaval et al. 2001). Há diversos *kits* diagnósticos sorológicos disponíveis comercialmente, todos utilizando TES-Ag, com boa sensibilidade e especificidade (Smith e Noordin, 2006). Apesar da variedade de testes comercializados, somente um foi motivo de publicação científica no início dos anos 90 por Jacquier et al. (1991); os testes comercializados frequentemente citam esse artigo como referência, embora a sensibilidade e especificidade desses *kits* difiram daquelas obtidas no primeiro estudo (Fillaux e Magnaval, 2013). Mesmo sendo este o método diagnóstico mais amplamente utilizado, relatos de reações-cruzadas são frequentes, especialmente em países com poliparasitismo (Muñoz-Guzmán et al. 2010; Smith et al. 2009; Jacquier et al. 1991). A falta de padronização de *kits* comerciais, do controle de qualidade do TES-Ag produzido, juntamente com as reações-cruzadas, pode tornar o uso deste diagnóstico difícil tanto para estudos soroepidemiológicos, como para o diagnóstico individual da toxocaríase (Macpherson, 2013; Smith e Noordin, 2006).

A fim de minimizar esse revés, Lynch et al. (1988) usaram a técnica de adsorção prévia de soros de pacientes com antígenos de *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e outros parasitos que potencialmente apresentam reações-cruzadas e aplicaram o teste ELISA utilizando TES-Ag, observando uma melhora significativa na especificidade e sensibilidade do teste.

O ELISA também vem sendo pesquisado para detectar a avidez dos anticorpos contra os antígenos de *Toxocara*, com o propósito de discriminar uma infecção inicial de uma crônica ou passada. Dziemian et al. (2008) demonstraram que o nível de avidez de IgG aumenta gradativamente no período de um ano em amostras de soro de crianças com toxocaríase, sendo mais útil para descartar uma infecção recente ao invés de confirmá-la. Elephant et al. (2006) apontaram que pacientes na fase crônica da doença apresentam alto índice de avidez.

Boldiš et al. (2015) obtiveram 43,8% de sensibilidade e 83,3% de especificidade ao avaliar o índice de avidéz de IgG, considerados baixos, e recomendam a análise com outros parâmetros como níveis totais de IgE e detecção de eosinófilos para indicar e discriminar as diferentes fases da infecção. Em coelhos, Bin et al. (2016) determinaram que os níveis de avidéz de IgG aumentam gradualmente por aproximadamente dois meses. Apesar dos avanços observados nas décadas recentes, não é possível discriminar, com esse método, se a infecção em questão é recente ou passada, pois os anticorpos anti-*Toxocara* podem persistir por longos períodos resultando em testes ELISA reagentes (Overgaauw e van Knapen, 2013).

Na tentativa de refinar o diagnóstico imunológico da toxocaríase, Rodríguez-Caballero et al. (2015) avaliaram a detecção de antígenos circulantes através do teste ELISA para captura de antígenos. Das 29 amostras reagentes pelo ELISA indireto, 31% delas foram reagentes pela técnica de captura de antígeno circulante pelo ELISA. Assim, as amostras positivas pela captura de antígenos indicam uma infecção ativa, já que há antígenos circulando no sangue, enquanto as amostras reagentes somente para o ELISA indireto indicariam uma infecção passada. Porém, Fillaux e Magnaval (2013) alertam que estudos sobre captura de antígenos circulantes datam da década de 1990 e até o momento de sua revisão, a grande falta de sensibilidade devido à baixa carga parasitária e ao modo de funcionamento do sistema imune impede que estes sejam testes confirmatórios ou de discriminação entre uma infecção recente e passada.

Da mesma forma, subclasses de IgG foram estudadas com o objetivo de aprimorar o diagnóstico da toxocaríase. Há quatro subclasses mais estudadas (IgG1 a IgG4), marcadas por diferenças no reconhecimento de antígenos em suas cadeias pesadas. Cada subclasse responde com maior ou menor sensibilidade e especificidade, dependendo do antígeno apresentado e assim, podem ser usadas no diagnóstico de forma particular de acordo com o patógeno que causa a infecção. Um estudo realizado no Reino Unido demonstrou maior sensibilidade utilizando o ELISA para IgG2 e maior especificidade para o IgG3 comparado ao ELISA com IgG total, contudo, a especificidade das subclasses são de aproximadamente 80%, e todas elas apresentam reatividade-cruzada

com soros de pacientes com diversos parasitos, entre eles *Ascaris lumbricoides* e *Strongyloides stercoralis* (Watthanakulpanich et al. 2008). Camundongos não apresentam o mesmo padrão de subclasses de IgG observado em humanos (IgG1, IgG2a e b e IgG3) (Fan et al. 2013); ainda assim, é possível realizar estudos com esse modelo animal para compreender sua função e posterior utilização na rotina laboratorial. Fan et al. (2003) relataram a presença marcante de IgG1 em camundongos ICR, bem como Pinelli et al. (2007), que além da predominância da subclasse IgG1, só observaram níveis significantes de IgG2a em camundongos BALB/c infectados com 1000 ovos larvados ao compará-los com os animais do grupo controle. Até o momento, as subclasses de IgG não têm uso na rotina laboratorial para o diagnóstico da toxocaríase (Fillaux e Magnaval, 2013).

Antígenos recombinantes também têm sido utilizados para a técnica de ELISA no aprimoramento do imunodiagnóstico. A produção do TES-Ag recombinante utilizando *Escherichia coli* resulta em menor tempo gasto, maior quantidade de antígeno e maior controle do processamento quando comparado ao método tradicional em meio de cultura, além de demonstrar melhor sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade para diagnóstico na rotina laboratorial e hospitalar. Yamasaki et al. (2000) notaram uma drástica redução da reatividade-cruzada com diversos trematoides, cestoides e nematoides com a aplicação do antígeno recombinante correspondente à proteína de 30 kDa em comparação ao TES-Ag nativo. Todavia, a combinação de antígenos e anticorpos das subclasses de IgG é provavelmente necessária para que os antígenos recombinantes obtenham uma taxa aceitável de sensibilidade e especificidade, e mais estudos são fundamentais para que se obtenha um consenso (Moreira et al. 2014). Um estudo que exemplifica o supracitado foi realizado por Mohamad et al. (2009), que utilizaram três antígenos recombinantes e os analisaram pela técnica de ELISA com as quatro subclasses de IgG, observando melhor especificidade ao utilizar a subclasse IgG4 e, segundo os autores, 100% de sensibilidade ao associar dois antígenos recombinantes.

Em um esforço para alcançar outras alternativas do aperfeiçoamento da técnica, Elefant et al. (2016) avaliaram o teste ELISA com glicanas pertencentes ao TES-Ag, quimicamente sintetizadas, obtendo boa sensibilidade e especificidade, mas com reatividade-cruzada em soros de pacientes com ascaridíase e fasciolíase.

Assim, mesmo com os recentes avanços, a aplicação do teste ELISA com quaisquer antígenos ou anticorpos utilizados deve ser interpretada com cautela e, preferencialmente, associada a outras técnicas diagnósticas (Ma et al. 2017; Fillaux e Magnaval, 2013).

2.6.3.2 *Western-blotting* (WB)

Frente às dificuldades observadas no teste ELISA, Magnaval et al. (1991) aplicaram a técnica de *Western-blotting* no diagnóstico da toxocaríase, também utilizando TES-Ag, e concluíram que as amostras de soro de pacientes e animais infectados com ovos de *T. canis*, ao reagir com o TES-Ag, apresentavam bandas de baixa massa molecular, na faixa de 35 a 24 kDa, que são, portanto, específicas para essa doença; e bandas de alta massa molecular (200 kDa, 132 kDa) apresentavam possível reação-cruzada para outras parasitoses, aumentando a sensibilidade e especificidade do diagnóstico. A partir desse momento, diversos estudos utilizaram a técnica para análise em humanos e animais. Em humanos, Zibaei et al. (2013a) demonstraram que o WB é mais sensível e específico que o ELISA, sendo ambos testes comerciais, e ressaltaram a importância desse método na confirmação do ELISA para o diagnóstico da toxocaríase; Bellanger et al. (2010) concluíram que o WB deve ser realizado independentemente do resultado do ELISA em pacientes com alterações na pele; Kang et al. (2014) relataram um caso de paciente com alterações hepáticas e na bexiga, com resultados não reagente para o ELISA, mas reagente para WB; Lim et al. (2014) demonstraram que todos os pacientes com resultados reagentes para o ELISA foram confirmados pelo WB. Roldán et al (2015) apresentaram grande evolução na especificidade da técnica após tratamento químico da proteína de aproximadamente 26 kDa do TES-Ag. Logo,

nota-se a importância desse método no diagnóstico da toxocaríase, independente da sua utilização como teste confirmatório ou parte de um método de triagem juntamente com o ELISA.

Em experimento com animais, Sarimehmetoğlu et al. (2001) detectaram bandas de 40, 28 e 24 kDa em camundongos *Swiss* e, mesmo concluindo que WB utilizando o TES-Ag é adequado para o diagnóstico sorológico, sugeriram que proteínas específicas devem ser purificadas a fim de aperfeiçoar a técnica; Morales et al. (2002) constataram sete bandas de diferentes massas moleculares, mas somente as bandas de 92 kDa e 35 kDa foram observadas durante todo o curso da infecção em coelhos e ademais, houve concordância entre os resultados do ELISA e WB; Lescano et al. (2012) demonstraram bandas de aproximadamente 97 kDa, 66 kDa e 45 kDa em animais coinfectados com *T. canis* e outros helmintos.

Apesar do avanço no diagnóstico da toxocaríase com o WB, esse método não é espécie-específico. Poulsen et al. (2015), ao testar soro de porcos infectados com *T. canis* e *T. cati*, observaram alta reatividade-cruzada entre os soros e TES-Ag de ambas espécies. Os soros dos animais infectados com as espécies *T. canis* e *T. cati* reagiram às tiras contendo TES-Ag de *T. canis*, apresentando bandas entre 94 a 28 kDa, com reatividade intensa nas bandas entre 34-28 kDa, e também reagiram com TES-Ag de *T. cati*, apresentando bandas entre 88 e 32 kDa. Com esse conhecimento, recomenda-se ao profissional da saúde realizar como rastreamento o teste ELISA para toxocaríase e providenciar o WB para a confirmação (Fillaux e Magnaval, 2013).

Técnicas sorológicas desenvolvidas para detectar anticorpos em infecções com pequenas cargas parasitárias resultaram em menor especificidade (Smith e Noordin, 2006). As reações-cruzadas com outros parasitos de importância médica e epidemiológica e a falta de conhecimento ou da suspeita desta doença por alguns profissionais da saúde fazem com que testes sorológicos para *Toxocara* não sejam frequentemente requisitados, levando à diminuição da produção de *kits* comerciais, fato que eleva os preços dos mesmos (Smith e Noordin, 2006). Questiona-se também a importância de somente um resultado sorológico reagente que, na ausência de histórico clínico

e epidemiológico e de outros testes reagentes, teria validade diagnóstica questionável, já que anticorpos residuais podem permanecer por vários anos circulantes. Somente pacientes que estão incluídos nesses critérios são definitivamente diagnosticados com toxocaríase e por isso, nem todas as infecções por *Toxocara* serão detectadas por testes sorológicos (Smith e Noordin, 2006; Fillaux e Magnaval, 2013). Os níveis de anticorpos anti-*Toxocara* são dose-dependentes em cães, outros animais paratênicos e, provavelmente, também em humanos (Kayes et al. 1985; Havasiová-Reiterová et al. 1995; Smith e Noordin, 2006). A baixa carga parasitária não causa, em geral, grandes morbidades ao paciente (exceto na LMO e NT) e pode não gerar níveis de anticorpos significantes para serem detectados pelos métodos acima revisados.

2.6.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi descrita por Mullis et al. (1986). Desde então, o diagnóstico de diversas doenças infecciosas foi beneficiado por essa técnica. Com esse método, pequenas quantidades de DNA podem ser amplificadas de uma variedade de amostras como saliva, soro, sangue total, fios de cabelo, entre outros. Dessa forma, poucos fragmentos de DNA podem ser amplificados, gerando mais fragmentos específicos de uma região do DNA, tornando a PCR uma técnica sensível. Esses fragmentos de DNA, ou produtos de amplificação, podem ser revelados por métodos de baixo custo, como a eletroforese em gel de agarose, geralmente corado com brometo de etídio ou outro componente, permitindo a separação dos produtos de DNA amplificados por tamanho e carga elétrica (Garibyan e Avashia, 2013). Após essa inovação, nomeada usualmente de PCR qualitativo, surgiram outras modificações: PCR quantitativo, PCR em tempo real, PCR *multiplex*, entre outros. Como é uma técnica sensível, deve-se ter atenção a qualquer contaminação, devido a resultados falsos. Os *primers* utilizados na reação também necessitam de uma sequência prévia para serem desenhados adequadamente, o que pode não estar disponível nos bancos de dados dependendo do patógeno estudado, e podem ligar-se de forma inespecífica em sequências similares, mas não idênticas, ao DNA alvo. Alguns

nucleotídeos, também utilizados nessa técnica, podem ser incorporados incorretamente em uma sequência pela DNA polimerase, apesar da ocorrência desse erro ser de baixa probabilidade (Garibyan e Avashia, 2013).

A PCR já é amplamente utilizada para o diagnóstico de diversas nematoidíases, seja em humanos ou animais. Caballero-Garcia e Jimenez-Cardoso (2001) detectaram produto de DNA de *T. spiralis* em amostras de sangue de camundongos BALB/c a partir do quinto dia pós-infecção; Mattiucci et al. (2017) e Yamada et al. (2017) relataram a detecção de DNA de larvas de *Anisakis pegreffii* em três pacientes por PCR em tempo real e *Anisakis simplex sensu stricto* em paciente com poliparasitismo pela técnica de PCR convencional, respectivamente. Em 2013, Espírito-Santo et al. relataram o primeiro caso de meningite eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* na cidade de São Paulo utilizando, entre outros métodos diagnósticos, a PCR em tempo real; Qvarnstrom et al. (2016) constataram que a PCR em tempo real é útil para o diagnóstico da meningite eosinofílica em LCR em pacientes infectados com *A. cantonensis*; Ximenes et al. (2014) apresentaram técnicas de PCR como uma potencial ferramenta diagnóstica para *Wuchereria bancrofti* em amostras de soro e urina; e o estudo de Suzuki et al. (2006) demonstraram a amplificação de produtos de DNA de *Schistosoma mansoni* em soro de camundongos ICR de duas a oito semanas após infecção, enquanto métodos sorológicos detectaram anticorpos anti-*Schistosoma* após seis semanas de infecção.

Na toxocaríase, a biologia molecular já foi usada para estudos genéticos populacionais, estudos sobre a evolução do parasito, taxonomia e diferenciação de espécies, este último visto na maioria dos casos em análise de contaminação do solo e em modelos murinos (Gasser, 2013). Os espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS-1 e ITS-2) apresentam-se como bons marcadores para a identificação e diferenciação de algumas espécies de *Toxocara*, sendo o segundo aquele que apresenta menor variação entre as espécies e, portanto, o mais específico (Jacobs et al. 1997; Gasser, 2013). De forma marcante, Jacobs et al. (1997) descreveram *primers* espécie-específicos situados na região do ITS-2 no DNA ribossomal (rDNA) ao avaliar amostras de vermes adultos ou ovos de *T. canis*, *T. cati* e *Toxascaris leonina*. Nesse mesmo ano, Rai et al. (1997)

empregaram a PCR convencional em amostras de fígado de camundongos ICR infectados com *T. canis*, além de ovos de *T. canis*, *T. cati* e *A. suum*, e a mesma técnica em produtos já amplificados, sugerindo o potencial diagnóstico do método. Igualmente impressionante, Zhu et al. (1998), fazendo uso de ferramentas moleculares, identificaram uma nova espécie em gatos na Malásia, *T. malaysiensis*.

A utilização da PCR no diagnóstico desta parasitose ainda é restrita a pesquisa, já que este método não está bem descrito e nem disponível em laboratórios de rotina. Ishiwata et al. (2004) tiveram sucesso em amplificar o DNA de uma única larva em tecido utilizando a PCR convencional. Em outro estudo, pesquisadores obtiveram sucesso ao amplificar DNA de vermes adultos do gênero *Toxocara* de vários países, mas este resultado não se repetiu em amostras de sangue de seres humanos (Li et al. 2007). Ainda, empregando a PCR em amostras de tecido hepático, Borecka et al. (2008a), utilizando os *primers* descritos por Jacobs et al. (1997), obtiveram bons resultados ao detectarem DNA de *T. canis*, sugerindo essa técnica como um auxílio no diagnóstico da toxocaríase. Pinelli et al. (2013) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real para detecção de DNA de *T. canis* e outros nematódeos da Superfamília Ascaridoidea em lavado broncoalveolar de camundongos BALB/c, que aliado ao sequenciamento, pode ser útil para o diagnóstico em pacientes com sintomas respiratórios. Zibaei et al. (2013b) amplificaram DNA de *T. cati* em amostras de tecido ocular e humor vítreo de gerbilos infectados com aproximadamente 240 ovos larvados, obtendo melhor sensibilidade quando comparada a técnicas histopatológicas e sorológicas. Recentemente, uma equipe de pesquisadores de diversos países relatou a predição do genoma de *T. canis* em diversos estágios e em ambos os sexos. Este importante estudo abre portas para pesquisas detalhadas e aprofundadas para a melhoria das técnicas moleculares como ferramenta diagnóstica aplicada para essa zoonose (Zhu et al. 2015).

Para a discriminação entre espécies de *T. canis* e *T. cati* e análise de amostras ambientais, Borecka & Gawor (2008b) desenvolveram um método simplificado para a extração do DNA a partir de amostras de solo, empregando os *primers* descritos por Jacobs et al. (1997). Outro estudo conseguiu amplificar

o DNA de ovos de *T. cati* por PCR em fezes de cães, mostrando a importância diagnóstica e epidemiológica dessa técnica (Fahrion et al. 2011); Durant et al. (2012) padronizaram a técnica de PCR em tempo real *duplex* quantitativo, obtendo fragmentos de DNA espécie-específicos para *T. canis* e *T. cati* em solos experimentalmente e naturalmente infectados, bem como em vermes adultos. Em 2013, Macuhova et al. detectaram a espécie *T. cati* pela técnica de PCR em solos de parques contaminados no Japão. No Irã, pesquisadores demonstraram a PCR como uma eficiente técnica para a detecção de DNA de *T. canis* e *T. cati* a partir de ovos no solo e em fezes de animais em parques públicos (Khademvatan et al. 2013;Khademvatan et al. 2014).

Em humanos, são poucos os relatos do uso dessa técnica. Caldera et al. (2013) relataram um caso de paciente com sintomas neurológicos e PCR positivo para *T. canis* no LCR. Em um estudo com 98 pacientes apresentando uveíte, nenhum apresentou PCR positivo para *T. canis* em sangue periférico ou humor vítreo, mas a sorologia foi reagente em 23,5% dos pacientes (Lim et al. 2014). Na Austrália, um relato de um paciente com sinais e sintomas sugestivos de LMO mostrou PCR negativo para *T. canis*, mas sua importância é destacada por ser a primeira vez no país, segundo os autores, que esta técnica foi utilizada para o diagnóstico da LMO em humanos (Tian e O'Hagan, 2015).

A PCR, no entanto, não é até o momento sensível e confiável do ponto de vista diagnóstico, já que a maioria dos estudos foram realizados em biópsias de tecidos, que necessitariam conter a larva dentro de um granuloma para ser detectado quantidades suficientes de DNA, o que torna o diagnóstico difícil, já que infecções humanas são normalmente causadas por um inóculo pequeno, e não avançaram na maioria das vezes além de modelos experimentais (Fillaux e Magnaval, 2013). O ciclo do parasito, aparentemente, não proporciona melhores perspectivas para a técnica, uma vez que as larvas são sequestradas nos tecidos (Smith et al. 2009). Deve-se lembrar, no entanto, que em modelos murinos a larva pode seguir a migração de forma quase ininterrupta, podendo tanto ser sequestrada em órgãos como continuar o ciclo visceral ou miotrópico-neurotrópico (Cookston et al. 1990; Othman et al. 2011). Soma-se a esse fato que a resposta imune, ao combater a larva, pode liberar células desse parasito

que contenham DNA e que poderia, assim como ocorre com *A. cantonensis*, ser detectado por esse método (Jarvi et al. 2015). Dessa maneira, apesar de alguns inconvenientes, a PCR pode ser uma ferramenta diagnóstica em amostras que não necessitam de técnicas invasivas.

2.7 Tratamento

Do mesmo modo que um diagnóstico positivo com ausência de sintomas e outros fatores não implica, necessariamente, em doença ativa, o tratamento da toxocaríase segue a mesma direção, ou seja, ele não é realizado se não houver um conjunto de aspectos clínicos que justifiquem seu uso, permanecendo, de certa maneira, controverso (Othman, 2012; Magnaval e Glickman, 2006). De forma geral, o tratamento é destinado a pacientes que apresentam a LMV com sinais e sintomas. Deve-se ter cautela ao tratar pacientes com TO com alguns sintomas, visto que é uma doença benigna e autolimitada, com remissão espontânea. Indivíduos com LMO necessitam de tratamento para reduzir o processo inflamatório no local da lesão, porém, não há consenso entre o tratamento da LMO somente com corticoesteroides ou associado a algum antihelmíntico, devido à cautela necessária à reação inflamatória causada pela morte da larva, o que pode resultar em piora no quadro do paciente. O medicamento é utilizado após algum tempo de infecção, e a larva em migração pode responder de forma diferente da larva que está presa em um granuloma. Alguns estudos mostram diferentes doses durante o tratamento, o que dificulta o conhecimento relacionado a esse aspecto (Othman, 2012).

A droga mais adequada para tratar a toxocaríase depende do que está disponível em cada país, da experiência do médico e dos efeitos adversos de cada medicamento: o albendazol, a dietilcarbamazina (DEC) e o mebendazol são as mais relatadas. O albendazol necessita de uma dieta rica em gordura para sua absorção, sua dose ótima não está bem descrita, bem como o tempo de duração da terapia. Mesmo sem ensaios comparativos, o mebendazol pode ser utilizado, mas tem menor efeito que o albendazol. Como uma terceira alternativa, a DEC é um composto de rápida absorção utilizado no tratamento de

filarioses desde 1949, mas deve atentar-se à sua utilização, pois o uso concomitante a corticosteroides pode inibir parcialmente seu mecanismo de ação. Como não há dados suficientes sobre o uso da ivermectina na toxocaríase, a droga não deve ser utilizada (Othman, 2012; Magnaval e Glickman, 2006).

A DEC, quando disponível, deve ser a droga de escolha, pelo baixo custo, grande disponibilidade e eficácia, provavelmente com melhores resultados comparada ao albendazol, contudo, as altas taxas de efeitos adversos envolvendo o SNC deve ser considerado no momento do tratamento (Othman, 2012; Magnaval e Glickman, 2006).

3. JUSTIFICATIVA

São evidentes as limitações no imunodiagnóstico da toxocaríase, sendo as mais importantes as reações-cruzadas com antígenos de helmintos e a detecção de anticorpos circulantes após longos períodos, dificultando a discriminação entre uma infecção ativa, cura ou cronicidade da doença, e o uso de técnicas de alto custo e laboriosas para o uso na rotina laboratorial.

A literatura sobre a PCR convencional no diagnóstico da toxocaríase é escassa. As poucas referências dizem respeito a amostras colhidas por método invasivo, com a utilização frequente de ferramentas moleculares auxiliares, o que torna a técnica cara e laboriosa. Até o momento, após pesquisa, não há relatos na literatura da padronização dessa técnica de biologia molecular utilizando amostras de soro e assim, procurou-se no presente trabalho, compreender a importância da PCR convencional para o avanço diagnóstico da toxocaríase em amostras de soro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

- Estudar a dinâmica da resposta imune humoral de camundongos experimentalmente infectados por *Toxocara canis*, utilizando duas técnicas imunológicas.
- Explorar o desempenho do diagnóstico molecular na toxocaríase, utilizando modelo murino.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a detecção e a dinâmica de anticorpos IgG anti-*Toxocara* dos camundongos infectados e não infectados por *T. canis* em diferentes datas e com diversos inóculos.
- Padronizar a técnica de PCR convencional para amostras de soro e compará-la às técnicas de ELISA e *Western-blotting*, relacionando os diferentes inóculos e dias após infecção.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 42 camundongos BALB/c, *Specific Pathogen Free* (SPF), machos, com idade entre 6 a 8 semanas e provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da USP. Esses foram divididos em quatro grupos e inoculados com 5, 50 ou 500 ovos larvados (L₃) (Grupos I, II e III, respectivamente) cada, em 200 µL de solução fisiológica por sonda esofagiana. Os animais do Grupo Controle (livres de infecção) receberam somente 200 µL de solução fisiológica. Os animais foram mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT) em condições de luz, temperatura e oxigenação apropriadas e água e alimento *ad libitum* (Tabela 1).

Tabela 1. Desenho experimental utilizado nos camundongos para infecção por *Toxocara canis*

Grupo	Nº de animais	Inóculo (Ovos larvados)
I	12	5
II	6	50
III	12	500
C	12	0
Total	42	

5.1.1 Coleta das amostras

Os animais de todos os grupos, previamente anestesiados com Xilasina e Quetamina nas concentrações de 10 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente, foram sangrados pelo plexo retro orbital aos 15, 30, 60 e 90 dias após infecção (dpi). Do total, 24 camundongos foram sangrados aos 120 dpi. Após a coleta, as amostras foram mantidas a 4°C por 12 horas, permitindo a coagulação e separação do soro. As amostras foram centrifugadas a 3.000rpm por cinco minutos e em seguida, os soros foram separados em alíquotas e conservados em freezer a -20°C até o seu processamento.

Ao final do experimento, três animais de cada grupo infectado, previamente anestesiados como anteriormente citado, foram eutanasiados em câmara de CO₂ e deles foram retirados fígado, carcaça e cérebro para a realização da recuperação de larvas.

Para a PCR convencional em órgãos, foram retirados aleatoriamente fragmentos de 25 mg de fígado, carcaça e cérebro de quatro animais dos grupos I e III no mesmo período, congelados a -20° até o momento do uso.

5.1.2 Obtenção de larvas e vermes adultos para diagnóstico molecular

Vermes adultos de *T. canis*, utilizados com a finalidade de avaliar a efetividade dos *primers* e a padronização da técnica de PCR, foram cedidos pelo Dr. Carlos Alberto Silveira Corrêa, do Departamento de Saúde Coletiva (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas – UNICAMP) e congelados no momento do recebimento. Após descongelamento, fragmentos de 10 mg, 25 mg e 30 mg dos vermes adultos foram excisados com o auxílio de um bisturi, macerados em tampão fosfato-salino (PBS, 0,01M pH 7,2) com um pistilo e cadinho, transferidos para um tubo de 1,5 mL e centrifugados a 13.000 rotações por minuto (rpm), por um minuto. Em seguida, o sobrenadante foi removido e o sedimento armazenado a -20°C até o momento do uso.

Conhecendo que o terceiro estágio é o infectante para hospedeiros paratênicos, larvas L₃ de *T. canis* foram obtidas para a detecção do produto amplificado por PCR, como descritas a seguir. Após a identificação das fêmeas e retirada dos ovos do útero, estes foram incubados em solução de formalina a 2%, por no mínimo 28 dias, com observação constante ao microscópio, para avaliar o embrionamento dos ovos. Quando larvados, os ovos foram centrifugados com PBS a 2.000 rpm por três minutos, retirando o sobrenadante e adicionando mais PBS, até a completa remoção da formalina a 2%. A seguir, os ovos foram transferidos para um béquer contendo solução de Hipoclorito de Sódio a 5%, por até cinco minutos, observando em alíquotas no microscópio óptico a remoção da camada externa mamilonada. Depois, lavou-se o conteúdo com PBS, centrifugando-o a 2.000 rpm por três minutos. A seguir, transferiu-se a solução de ovos larvados e PBS para um Erlenmeyer contendo pérolas de vidro, onde se agitou lentamente por até 30 minutos, para a ruptura da camada interna dos ovos e liberação das larvas, observando esse fenômeno e a motilidade das larvas em alíquotas no microscópio de luz.

Ao final, transferiu-se a solução para um funil de *Baermann* (1917) modificado (figura 3), vedado com um filme plástico em sua porção final. Adicionou-se PBS a 37°C, mantendo em estufa à mesma temperatura por 24 horas. As larvas ativas migraram para o final do funil e depois foram transferidas para um tubo cônico. Após centrifugação a 4.000 rpm por um minuto, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para um tubo de tamanho adequado e foram assim armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Quando não foi observada motilidade das larvas, a solução foi transferida para um tubo de 1,5 mL e centrifugado como descrito acima, para posterior armazenamento a -20 °C.

Figura 3. Aparelho de *Baermann* modificado – Dra. Yrma A. Espinoza (comunicação pessoal)

5.2 Diagnóstico imunológico:

5.2.1 ELISA:

As amostras de soro coletadas foram testadas para detectar os anticorpos anti-*Toxocara* da classe IgG. Empregou-se o TES-Ag preparado neste laboratório a partir da cultura de larvas de terceiro estágio em meio *Eagle* baseado na técnica padronizada por Bach-Rizzatti (1984) a partir da técnica de De Savigny (1975) e modificada por Elefant et al (2006).

O ELISA foi realizado de acordo com Lescano et al. (2012), com modificações. Placas de poliestireno rígido com 96 cavidades, com fundo chato e de alta ligação, foram sensibilizadas com 100 µL de TES-Ag diluídos a 1:800 em PBS 0,01M (pH 7,2) na concentração de 10 µg/mL. Incubou-se a 37°C por duas horas e em seguida, foi mantida em geladeira a 4°C por 16 horas. Depois, a placa foi bloqueada adicionando 200 µL por poço da solução de PBS-*Tween*-20 gelatina a 0,25% (PBS-T-Gel), incubando por uma hora a 37°C. A seguir, a

placa foi lavada com PBS- *Tween* (PBST) 0,5% por três vezes de 5 minutos cada. Adicionou-se 100 µL por poço dos soros dos animais de todos os grupos, diluídos em PBS-T-Gel a 1:100 em cada orifício e em duplicata. Após incubar por uma hora a 37°C, lavou-se a placa por três vezes de cinco minutos cada e, depois da secagem das placas, adicionou-se 100 µL por poço do conjugado enzimático anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (*y-Chain specific*, *Sigma Aldrich*, MO, EUA) diluído a 1:4000 em PBS-T-Gel. A placa foi incubada por uma hora a 37°C e, depois, repetiu-se o processo de lavagem e secagem. Em seguida, foi utilizado para a revelação o substrato O-Phenylendiamina (1,2-Benzenediamina) [C₆H₈N₂.2HCL] acrescido de Peróxido de Hidrogênio (*OPD-FAST* - *Sigma Aldrich*, MO, EUA), conforme instruções do fabricante, com incubação em câmara escura e à temperatura ambiente por até 25 minutos. Passado este tempo, bloqueou-se a reação enzimática adicionando 50 µL de ácido sulfúrico 4N em todas as cavidades. Considerou-se padrão positivo os soros de animais com 70 dias de infecção de experimentos prévios e padrão negativo as amostras dos animais do Grupo Controle.

Os resultados foram analisados por leitura espectrofotométrica da placa no comprimento de onda de 450nm, em aparelho *Titertek – Multiskan MCC/3408*, versão 2.20.

O limiar de reatividade (*cut-off*) foi calculado da seguinte maneira, considerando a densidade óptica (D.O) dos animais do Grupo Controle, para cada data após infecção:

Média D.O + 2 × desvio-padrão.

5.2.2 Western- blotting

5.2.2.1 Análise do perfil eletroforético do antígeno

A análise eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), em condições desnaturantes e em suporte vertical para mini gel (SCIE-PLAS, LTD, Cambridge, GB) segundo a técnica de Laemmli (1970), utilizando aproximadamente 20 µg/cm de gel (Uparanukraw et al. 1999) das frações antigênicas do TES-Ag. A alíquota de TES-Ag foi ressuspensa em 215 µL tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,5, SDS a 10% e glicerol a 20%, DTT 0,1M, Azul de Bromofenol 0,2%), aquecida a 100°C em banho-maria por cinco minutos e aplicada em dois géis junto ao padrão de massa molecular (*Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA*) em poços diferentes. Os géis foram submersos em tampão de corrida Tris (0,3%)-Glicina (1,5%) e a seguir, empregou-se uma corrente de 100 Volts e 20mA por aproximadamente duas horas. Os géis foram corados com Nitrato de Prata pela técnica de Nielsen e Brown (1984) e digitalizado para documentação.

5.2.2.2 Imunodeteção de bandas proteicas

Na eletrotransferência, foram utilizadas membranas de Fluoreto de Polivinildileno (PVDF) de 20µm (*Bio-Rad Laboratories Headquarters, CA, EUA*) em sistema Mini Trans-blot, montado como descrito a seguir: esponja, papéis filtro, membrana, novamente papéis filtro e esponja, formando assim um “sanduíche”. Todas foram umedecidas em etanol absoluto e em seguida, umedecidas em tampão de transferência (Tris 10mM, Glicina 95mM, etanol 20% e SDS 10%). A amperagem empregada foi de 200mA e 50 Volts, por 18 horas.

Após a eletrotransferência das frações antigênicas, as membranas contendo o TES-Ag, secas, foram cortadas em tiras de aproximadamente 4mm e processadas com adaptações de Elefant et al. (2011) e Corral et al. (2017).

Para avaliação inicial da técnica, após a eletrotransferência, membranas com TES-Ag reagiram com soros de camundongos sabidamente reagentes para

T. canis diluídos em 1:100, 1:50 e 1:20. O conjugado anti- IgG de camundongo marcado com peroxidase (γ -Chain specific - Sigma Aldrich, MO, EUA) foram diluídos em 1:500 e 1:200. Após análise, estabeleceu-se a diluição de 1:50 para os soros e 1:200 para o conjugado em PBS-*Tween* acrescido de leite desnatado em pó a 1% (PBSTLD 1%) em todas as datas pós-infecção (Figura 4).

Figura 4. Padronização do *Western-blotting* com diferentes diluições de soro positivo de camundongos e conjugado anti-IgG de camundongo. MM - Padrão de Massa Molecular (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, EUA)

Foi realizado o bloqueio prévio dos sítios inespecíficos com 1 mL PBSTLD a 5% por uma hora, à temperatura ambiente e com agitação constante. As tiras foram lavadas três vezes por cinco minutos cada com PBST. A seguir, os soros dos animais de todos os grupos foram diluídos na proporção 1:50 em PBSTLD 1%, adicionados em cada tira, e incubados sob agitação constante a 4°C por 18

horas. Após seis lavagens de cinco minutos cada com PBST, incubou-se as tiras da membrana sob agitação constante com conjugado enzimático anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (*γ-Chain specific*, *Sigma Immunochemicals*) diluído em PBSTLD 1% a 1:200 por duas horas em temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem citado acima para em seguida prosseguir com a revelação, com aproximadamente 800 µL de 3,3 Diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (*Sigma Aldrich*, MO, EUA) e peróxido de hidrogênio, até o surgimento das bandas (5-10 minutos em temperatura ambiente). A reação foi interrompida adicionando água destilada. A leitura das bandas reagentes dos soros dos animais dos grupos infectados foi realizada pelo programa *VisionWorks Anaylisis Software*, versão 8 (Analytik Jena, Alemanha).

5.3 Diagnóstico Molecular

5.3.1 Extração de DNA das amostras de órgãos de camundongos, larvas e vermes adultos de *T. canis*

A extração de DNA de órgãos, larvas e vermes adultos de *T. canis* foi realizada utilizando o kit comercial QIAamp *DNA Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações.

Foram adicionados 80 µL de PBS em cada tubo com amostra de larvas, fragmentos de vermes adultos (10 mg, 25 mg e 30 mg) e 25 mg de cada órgão, e completamente homogeneizadas em vórtex. Em seguida, foram adicionados 100 µL de Tampão ATL e 20 µL de proteinase K, e homogeneizados em vórtex por alguns segundos.

As amostras foram incubadas a 56°C por duas horas e após esse processo, adicionou-se 200 µL de Tampão AL. Após homogeneização no vórtex, as amostras foram incubadas a 70°C por 10 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas rapidamente e adicionou-se 200 µL de etanol absoluto. O

conteúdo foi então homogeneizado no vórtex, centrifugado brevemente e transferido para uma coluna acoplada ao tubo coletor.

As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por um minuto e o tubo coletor com o filtrado foi descartado e repostado. Em seguida, adicionou-se 500 µL de Tampão AW1. As amostras foram novamente centrifugadas a 8000 rpm por um minuto, seguida de nova substituição do tubo coletor e depois, foram adicionados às amostras 500 µL do Tampão AW2. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por três minutos, o tubo coletor foi descartado, e as amostras transferidas para um tubo de 1,5 mL. Em seguida, as amostras foram eluídas em duas etapas adicionando 50 µL do tampão de eluição. Em cada etapa, a amostra foi centrifugada a 8000 rpm por um minuto. Ao final, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop VD-1000 US-VIS versão 3.2.1 (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, EUA) e armazenado em freezer a -20°C até o momento da análise.

5.3.2 Extração de DNA das amostras de soro

De forma similar ao item 5.3.1, extraiu-se o DNA das amostras de soro dos animais de todos os grupos de acordo com o protocolo do *kit* comercial supracitado para amostras de soro, com modificações descritas a seguir.

Foram separadas alíquotas de 25 µL do soro de todos os animais, formando *pools* das alíquotas de cada grupo. Foram retirados 25 µL de cada *pool* e adicionados 175 µL de tampão fosfato-salino (PBS).

Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 20 µL de proteinase K em cada amostra, 200 µL de tampão AL e após homogeneização em vórtex, foram incubadas a 56°C por 10 minutos. Adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto, e após homogeneização em vórtex e breve centrifugação, as amostras foram transferidas para uma coluna acoplada a um tubo coletor.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por um minuto e o tubo coletor com o filtrado foi descartado e substituído. Foram adicionados 500 µL do tampão AW1 e novamente, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm

por um minuto. Após nova substituição do tubo coletor, adicionou-se 500 µL do tampão AW2, com centrifugação a 13000rpm por três minutos. O tubo coletor com filtrado foi descartado e a coluna foi realocada em um tubo de 1,5 mL. Adicionaram-se 50 µL do tampão de eluição, seguido de centrifugação a 8000 rpm por um minuto, repetindo esse processo uma vez. A seguir, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop VD-1000 US-VIS versão 3.2.1 (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, EUA) e armazenadas em freezer -20°C até o momento da análise.

5.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

5.3.3.1 Primers

Para a amplificação dos fragmentos de 380 pares de base (pb) e 141 pb, foram utilizados os *primers* espécie-específicos para *T. canis*, referentes ao segundo espaçador transcrito interno (ITS-2) do DNA ribossomal, descritos por Jacobs et al. (1997) e Durant et al. (2012), respectivamente (tabela 2). Para o controle interno da extração de DNA, foram utilizados *primers* universais com fragmento de aproximadamente 140 pb, localizado na região SSU-rDNA de eucariotos, descrito por Wang et al (2013).

Tabela 2. *Primers* utilizados para reação da PCR para detecção DNA nas amostras de soro, larvas e vermes adultos de *T. canis*

Primers	Sequências (5'-3')	Pares de bases (pb)	Ref.	Sigla
<i>Forward</i>	5'- AGTATGATGGGCGCGCCAAT -3'	380 pb	Jacobs et al. (1997)	Jacobs
<i>Reverse</i>	5'- TAGTTTCTTTTCCTCCGCT -3'			
<i>Forward</i>	5'-GCGCCAATTTATGGAATGTGAT-3'	141 pb	Durant et al. (2012)	Durant
<i>Reverse</i>	5'-GAGCAAACGACAGCSATTTCTT-3'			
<i>Forward</i>	5'-TCTGCCCTATCAACTTTCGATGG-3'	140 pb	Wang et al. (2013)	Universal
<i>Reverse</i>	5'-TAATTTGCGCGCCTGCTG-3'			

5.3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada em um volume total de 10 µL, composto pelo *mix* de Água MiliQ, tampão (*Invitrogen*, California, EUA), desoxinucleotídeos (dNTPs), cloreto de Magnésio (MgCl₂) (*Invitrogen*, California,EUA), *Platinum® Taq* Polimerase (*Invitrogen*, California,EUA), *Primer forward* e *reverse* e o DNA extraído de cada amostra, conforme tabela 3.

Tabela 3. Reagentes, volumes e concentração utilizados na PCR

Reagentes	Volume	Concentração
Tampão PCR	1,0 µL	10X
DNTP	0,5 µL	10mM
MgCl ₂	0,6 µL	50mM
<i>Primer Forward</i>	0,5 µL	20pmol/µL
<i>Primer Reverse</i>	0,5 µL	20pmol/µL
Enzima Taq Polimerase	0,1 µL	-
DNA extraído	4 µL	-
Água MiliQ (q.s.p.)	2,8 µL	-

Para determinar a temperatura de anelamento, realizou-se o gradiente de temperatura, utilizando o *primer* Jacobs, com resultados observados na figura 5. Após análise, determinou-se utilizar a temperatura de 60°C para a reação de PCR.

Figura 5. Amplificação de produtos de DNA de verme adulto de *T. canis* em gradiente de temperatura utilizando o *primer* Jacobs. As temperaturas da figura estão em graus *Celsius*. PM - Padrão de Peso Molecular de 100pb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf Mastercycle® Pro* (*Eppendorf*, Hamburgo, Alemanha), para todos os *primers*, como descrito na figura 6. Um controle positivo (verme adulto de *Toxocara* spp.) e um controle da reação (água) foram incluídos em todas as reações. A sequência de reações de PCR, incluindo triplicatas em amostras de órgãos, está demonstrada na figura 7.

Figura 6. Sequência da PCR convencional realizada para todos os *primers*, em todas as amostras

Figura 7. Sequência realizada nas reações de PCR e eletroforese em amostras de DNA extraído de soro e órgãos, empregando os *primers* Jacobs, Durant e Universal

5.3.3 Eletroforese

Foram utilizados 5 μ L do produto de amplificação de cada amostra, homogeneizado em 3 μ L de *Blue Juice Gel Loading Buffer* (*Invitrogen*, California, EUA) e, juntamente com 3 μ L do padrão de peso molecular de 100 ou 50 pb (*Invitrogen*, California, EUA), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%. A eletroforese foi processada em tampão TAE 1X (*Invitrogen*, California, EUA) sob tensão elétrica de 90V, corrente elétrica de 400mA por 80 minutos. O resultado foi observado em transiluminador com luz ultravioleta e documentados pelo sistema de captura de imagens *Alphalmage 2200* (*AlphaInnotech*, California, EUA) ou, em sua ausência, por câmera digital.

5.3.4 Sequenciamento

A fim de confirmar o produto amplificado a partir do DNA de verme adulto de *T. canis*, foi realizada a reação de sequenciamento baseada na metodologia de Sanger et al. (1977) utilizando didesoxinucleotídeos (ddNTPs) contendo marcadores fluorescentes, conforme o *kit ABI Prism BigDye Terminator* (*Applied Biosystems*, CA, EUA), com modificações no protocolo proposto pelo fabricante.

Os produtos gerados foram purificados com a enzima EXOSAP (*GE Healthcare*, Piscataway, NJ, EUA) conforme instruções do fabricante, utilizando os reagentes descritos na tabela 4, com volume total de 20 μ L.

Tabela 4. Reagentes, volume, e concentração para o sequenciamento da amostra de produto amplificado do DNA de verme adulto de *T. canis*

Reagentes	Volume	Concentração
BigDye <i>mix</i>	4 µL	-
Tampão 5X	2 µL	200 mM Tris-HCl pH 9,0 5mM MgCL ₂
<i>Primers</i>	2 µL	1,6 pmol/µL
Produto purificado	2 µL	-
Água Mili-Q	10 µL	-

O sequenciamento foi composto por 40 ciclos de 95°C por dois minutos; 96°C por 30 segundos; 52°C por 30 segundos seguido de 60°C por quatro minutos para extensão final. O produto final foi precipitado adicionando 65 µL de solução (EDTA 125Mm e etanol absoluto), seguido por incubação em temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, a amostra foi centrifugada por 30 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado restante foi adicionado 60 µL de etanol 70% seguido por centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos. Foram adicionados ao precipitado 10 µL de formamida, que foi incubado a 95°C e após, resfriado em banho de gelo e submetido ao sequenciamento automático ABI 3500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA).

As sequências geradas foram analisadas utilizando o programa BioEdit (*Biological Sequence Alignment Editor*) (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>), e alinhadas com sequências presentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/tbl2asn2>), utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

5.4 Recuperação de larvas

Ao final do estudo, para confirmar a infecção experimental, foi realizada a recuperação de larvas segundo Xi & Jin (1998), modificado por Lescano et al. (2004). Os órgãos retirados foram depositados no aparelho de *Baermann* (1917) modificado constituído de um béquer, onde estava inserido um coador de nylon com malha de 4 mm². Adicionou-se a solução de HCl 0,5% até a total cobertura dos mesmos. Os órgãos foram assim incubados a 37°C por 24 horas. Logo após, foram descartados em sacos adequados para o fim e os sedimentos foram centrifugados em tubos cônicos, a 2000 rpm por cinco minutos. A seguir, o sobrenadante foi aspirado até deixar 2 mL de sedimento, homogeneizado e lido em alíquotas de 100 µL em microscópio óptico para observação e quantificação de possíveis larvas.

5.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados com o teste ELISA foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA, teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas pelo teste de Dunn, com $P < 0,05$.

5.6 Comissão de Ética

Este trabalho faz parte do projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo nº CPE-IMT/254, e pela comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o protocolo nº 162/15.

6. RESULTADOS

6.1 ELISA

Os resultados do teste ELISA estão representados nas figuras 8 e 9.

Aos 15 dpi, observou-se menor detecção de anticorpos nos animais dos grupos II e III, ao passo que o grupo I permaneceu negativo (figura 8 A). Entre os grupos I e III, bem como o grupo III e controle, foi observada significância estatística ($P < 0,0006$).

A detecção de anticorpos anti-*Toxocara* aumentou gradualmente nos grupos infectados aos 30 dpi. (figura 8 B), com significância estatística tal qual observada na data anterior ($P < 0,0005$).

Em seguida, aos 60dpi., notou-se aumento nos níveis de anticorpos IgG nos grupos I, II e III (figura 9 A). Houve significância estatística como observado aos 15 dpi. e ainda, notou-se o mesmo entre os grupos II e controle ($P < 0,0007$).

Aos 90 dpi., houve discreta diminuição nos níveis de anticorpos do grupo III, entretanto, constatou-se aumento na detecção dos mesmos nos grupos I e II (figura 9 B). Notou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II, e relevância estatística entre os grupos II e III relacionados ao grupo controle ($P < 0,0007$).

No último período de coleta (120 dpi.), observou-se pequena redução na detecção de anticorpos anti-*Toxocara* nos grupos II e II, bem como um discreto aumento nos níveis do grupo I (figura 9 C). A diferença estatística foi significativa à semelhança do relatado aos 60dpi. ($P < 0,0008$).

Figura 8. ELISA IgG para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* utilizando soro de camundongos infectados. A- 15dpi; B - 30dpi. (*) Diferença significativa entre os grupos infectados e controle; (°) Diferença significativa somente entre os grupos infectados

6.2 Western-blotting:

6.2.1 Análise do perfil eletroforético

Uma alíquota do TES-Ag foi reservada para a avaliação do perfil eletroforético. Foram observadas bandas de 90, 70, 50, 47, 35, 30, 18 e 15 kDa (figura 10).

Figura 10. Perfil eletroforético do TES-Ag em SDS-PAGE por coloração de Nitrato de Prata. 1673µg/mL de TES-Ag em 10 µl de tampão de amostra

6.2.2 Imunodeteção de bandas proteicas

Na figura 11 está demonstrado o perfil de bandas detectadas por anticorpos IgG anti-*Toxocara* de camundongos frente ao TES-Ag no decorrer da infecção.

As bandas de 45 e 35 kDa foram identificadas nos camundongos dos grupos II e III aos 15 dpi. Aos 30 dpi., os três grupos de animais infectados apresentaram bandas de 40, 35 e 30 kDa. Nos grupos II e III também foram detectadas bandas de 55 e 45 kDa. Bandas de 90, 80 e 70kDa foram detectadas no grupo III na mesma data.

Aos 60 dpi. e aos 90 dpi. todos os grupos de animais infectados apresentaram bandas de 65, 40, 35 e 30 kDa. Também foram detectadas bandas de 90, 80, 75 e 70 kDa no grupo II, e o grupo III revelou a banda de 55 kDa na primeira data. Adicionalmente, aos 90dpi., os grupos II e III exibiram bandas de 85, 80, 75, 70 e 45 kDa.

Após 120 dpi., o grupo I revelou somente a banda de 30 kDa, enquanto os grupos II e III mostraram bandas de 80, 75, 70, 65, 50, 45, 40, 35 e 30 kDa. Ademais, o grupo II também revelou a banda de 85 kDa.

A frequência detalhada das bandas identificadas neste estudo está descrita na tabela 5 e a figura 12 apresenta a frequência de bandas no curso da infecção. A banda de 30 kDa apresentou aumento gradual na frequência em todas as datas pós-infecção. Um aumento progressivo foi observado em todos os grupos aos 30dpi., e tem o pico na sua frequência aos 60dpi., presente em todos os animais dos três grupos nessa data. Aos 90dpi. e aos 120dpi., a frequência dessa banda diminuiu consideravelmente no grupo I, mas foi mantida nos grupos II e III.

As bandas de 40 e 35 kDa apresentaram frequências similares, com aumento gradual de frequência nos grupos de animais infectados a partir de 30dpi. até os 120dpi. nos grupos II e III. No grupo I, essas bandas diminuem gradualmente sua frequência a partir dos 90dpi., e estão ausentes aos 120dpi.

Supreendentemente, a banda de 65 kDa é frequente nos três grupos infectados a partir dos 60dpi., e nos grupos II e III, sua frequência foi mantida até o final do experimento.

Figura 11. *Western-blotting* utilizando soro de camundongos aos 15,30,60, 90 e 120 dpi. I – soro de animais do grupo I; II – soro de animais do grupo II; III – soro de animais do grupo III; C – soro de animais do grupo controle; MM – Padrão de Massa Molecular (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, EUA)

Tabela 5. Frequência de reatividade de anticorpos IgG frente ao TES-Ag em animais durante o curso da infecção

(kDa)	15 dpi.			30 dpi.			60 dpi.			90 dpi.			120 dpi.		
	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII	GI	GII	GIII
90	-	-	-	-	-	1/6	-	1/6	-	-	-	-	-	-	-
85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/6	2/6	-	6/6	-
80	-	-	-	-	-	1/6	-	2/6	-	-	4/6	2/6	-	6/6	5/6
75	-	-	-	-	-	-	-	1/6	-	-	4/6	2/6	-	6/6	5/6
70	-	-	-	-	-	1/6	-	2/6	-	-	4/6	2/6	-	6/6	3/6
65	-	-	-	-	-	-	5/6	6/6	5/6	2/6	4/6	6/6	-	5/6	6/6
55	-	-	-	-	2/6	6/6	-	-	2/6	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4/6	4/6
45	-	2/6	2/6	1/6	1/6	-	-	2/6	4/6	-	1/6	6/6	-	6/6	1/6
40	-	-	-	1/6	6/6	4/6	5/6	6/6	6/6	4/6	6/6	6/6	-	6/6	6/6
35	-	-	-	1/6	1/6	4/6	4/6	6/6	6/6	2/6	5/6	6/6	-	6/6	6/6
30	-	4/6	4/6	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	4/6	6/6	6/6	2/6	6/6	6/6

(-) bandas não reconhecidas; (n_i/n_t) número de camundongos individuais que reconheceram bandas/número de camundongos total por grupo

Figura 12. Frequência de bandas reconhecidas por anticorpos IgG contra frações de TES-Ag, nos animais inoculados com 5, 50 e 500 ovos larvados (grupos I, II e III, respectivamente) de acordo com o dia pós infecção

6.3 Diagnóstico Molecular

6.3.1 Validação

Foram amplificados os produtos de DNA de verme adulto de *T. canis* nas concentrações de 5 e 2,5ng/μL utilizando o *primer* Jacobs (figura 13).

Figura 13. Amplificação com diferentes concentrações de DNA de verme adulto de *T. canis*, empregando o *primer* Jacobs. 1- 10ng/μL; 2- 5ng/μL; 3- 2,5ng/μL; 4- 1ng/μL. PM - Padrão de Peso Molecular de 100pb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

A reação de PCR detectou DNA dos produtos amplificados de vermes adultos e larvas de *T. canis*, exibindo bandas de aproximadamente 380pb e 141pb utilizando os *primers* Jacobs e Durant, respectivamente, sem amplificação das amostras de soro de um animal do grupo controle. A técnica também amplificou, ao utilizar o *primer* Jacobs, produtos de 1000pb de DNA de verme adulto de *T. cati*. Com o *primer* Durant, não houve amplificação de produtos de DNA de verme adulto de *T. cati* (figura 14 A e B).

Figura 14. Amplificação de DNA utilizando o *primer* Jacobs (A) e Durant (B). 1- Verme adulto de *T. canis*; 2- larva de *T. canis*; 3- restos de ovos e larvas de *T. canis*; 4 - verme adulto de *T. cati*; 5 - grupo controle. PM - Padrão de Peso Molecular de 100pb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

Ao testarmos o desempenho da extração de DNA em fragmentos de vermes adultos de *T. canis*, observaram-se bandas de cerca de 380pb utilizando o *primer* Jacobs em todas as frações analisadas (Figura 15 A). Já o *primer* Durant revelou bandas de aproximadamente 141pb no DNA obtido a partir das frações de 25 mg e 30 mg de verme adulto (Figura 15 B). Utilizando o *primer* Jacobs, a amostra de DNA de cérebro de um animal do grupo III apresentou bandas em torno de 300 pb e 380 pb, e banda de aproximadamente 141 pb com o *primer* Durant. Para o DNA extraído de amostra de hemácias, não houve amplificação do DNA alvo utilizando ambos os *primers*. (Figura 15 A e B). Assim, decidiu-se usar, para controle positivo da reação, o DNA extraído da fração de 25 mg de verme adulto de *T. canis*.

Figura 15. Amplificação de DNA empregando o *primer* Jacobs (A) e Durant (B). 1- Fração de 10 mg de verme adulto de *T. canis*; 2- fração de 25 mg de verme adulto de *T. canis*; 3- fração de 30 mg de verme adulto de *T. canis*; 4- cérebro; 5- hemácias. PM - Padrão de Peso Molecular de 100 pb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

O sequenciamento apresentou alta similaridade da sequência do verme adulto de *T. canis* (~96%) com as sequências depositadas nas bases de dados (Figura 16).

```

1  TACTGTGTTACGCGCAGGNNTCTGTGGTGCATTTCGGTGAGCTATGCTGGT
51  GTGGTAATGGATATTGTGCAATTGTACAGCGTACCTCGCTAAGGAAATAT
101 TCGCACAAGAAATGGCTGTCGTTTGCTCGTAAAGAGGCAAAATTGGCCAT
151 GAGTGTATGTTGCGTTGCTTCACGATACGGCCTCCAGCAAACGTTGTTTA
201 TTGTTTGGTTGTGGCAGCATCCAGGTTGGAGGTGGCGTTATCGGTCGCTT
251 GAATGAGGAATGCATGGCGAATGGTTGAAATGAGATTTTTTTTTTTTGGAC
301 CCCCCCTCAGCCGGGGCCCCCCTTAATTTTAACCTTTTAATTAAGGGAA
351 GAAAAAAAAACAAAAAAA

```

Figura 16. Sequenciamento de DNA de verme adulto de *T. canis* utilizando o *primer* Jacobs

6.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase em amostras de soro

Em função do tamanho e peso dos animais e da natureza da coleta, as amostras de soro obtidas foram exíguas. Assim, os testes foram realizados em *pool* de amostras de soro.

Testou-se diferentes volumes de soro (25, 50, 130 e 150 µL), diluídos em PBS até completar 200 µL para a extração de DNA. Após padronização, foi realizada a PCR nas amostras de todos os grupos.

Não houve amplificação de DNA específico nos grupos I, II, III e controle em nenhuma data pós-infecção, empregando ambos os *primers*. A amostra do controle negativo da PCR (água) não apresentou bandas em nenhuma das reações (figuras 17 a 19).

Ainda, somente na PCR realizada com as amostras do grupo II, estavam presentes bandas de cerca de 1100 pb nas amostras de DNA de soro aos 15, 30, 60 e 90 dpi. Os animais não infectados seguiram padrão similar: bandas de aproximadamente 1100 pb foram observadas. O controle positivo da reação (DNA de verme adulto de *T. canis*) apresentou banda de aproximadamente 380pb e amplificação inespecífica de 650 pb com o *primer* Jacobs. Foi observada a banda alvo (141 pb) utilizando o *primer* Durant na mesma amostra (Figura 18).

Após resultados negativos, foi empregado o *primer* universal nas amostras de soro dos animais de todos os grupos. Com este, todas as amostras apresentaram bandas-alvo (Figura 20).

Figura 17. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo I e controle utilizando o *primer* Jacobs (A) e Durant (B). 1 a 4 - amostras de soro do grupo I aos 15, 30, 60 e 90 dias pós infecção; 5 – controle positivo; 6 a 9 – amostras de soro do grupo controle aos 15, 30, 60 e 90 dias pós infecção; 10 - água. PM - Padrão de Peso Molecular de 100bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

Figura 18. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo II e controle utilizando os *primers* Jacobs (A) e Durant (B). 1 a 5- amostras de soro do grupo II aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias pós infecção; 6 a 8 - amostras de soro do grupo controle aos 30, 60 e 90 dias pós infecção; 9 – água; 10 – soro de animal não infectado; 11 – controle positivo. PM - Padrão de Peso Molecular de 100bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

Figura 19. Amplificação de DNA de amostras de soro do grupo III e controle utilizando os *primers* Jacobs (A) e Durant (B). 1 a 4 - amostras de soro do grupo III aos 15, 30, 60 e 90 dias pós infecção; 5 - controle positivo; 6 a 9 - amostras de soro do grupo controle aos 15, 30, 60 e 90 dias pós infecção; 10 - água. PM - Padrão de Peso Molecular de 100bp (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

Figura 20. Amplificação de DNA de amostras de soro dos grupos I, II, III e controle utilizando o *primer* Universal. 1 – verme adulto de *T. canis*; 2 a 5: amostras de soro do grupo I aos 15, 30, 60 e 90 dpi., respectivamente; 6 a 10 – amostras de soro do grupo II aos 15, 30, 60, 90 e 120 dpi., respectivamente; 11 a 14 – amostras de soro do grupo III aos 15, 30, 60 e 90 dpi., respectivamente; 17 – amostra de soro do grupo controle; 18- água. PM- padrão molecular de 50 pb (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

6.3.3 Diagnóstico molecular em amostras de órgãos

O resultado da PCR em amostras de órgãos está representado na figura 21.

Com o *primer* Jacobs, foram observadas bandas de aproximadamente 380pb em alguns animais do grupo III na maioria dos órgãos. Nota-se a presença de bandas de 300, 380 e acima de 800 pb no DNA das amostras de fígado nos grupos I e III.

Ao empregarmos o *primer* Durant, animais do grupo III apresentaram bandas de aproximadamente 141pb em quase todos os órgãos, exceto no DNA das amostras de fígado.

Após a triplicata, surpreendentemente, houve aumento na positividade de amostras de fígado e carcaça utilizando o *primer* Jacobs em amostras do grupo I, sem alteração nas amostras dos outros grupos. O mesmo foi observado em amostras de produtos de DNA de cérebro empregando o *primer* Durant (figura 22).

Figura 21. DNA amplificado nas amostras de fígado (A e B), carcaça (C e D) e cérebro (E e F), utilizando os *primers* Jacobs (A, C e E) e Durant (B, D e F). 1- controle positivo; 2 a 5- amostras de órgãos dos animais pertencentes ao grupo I; 6 a 9- amostras dos animais pertencentes ao grupo III; 10 - Água; 11 – animal não infectado. PM. Padrão de peso molecular de 100pb (A, C) e 50pb (B, D), (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA, EUA)

Figura 22. Positividade da PCR Convencional em amostras de órgãos utilizando o *primer* Jacobs e Durant

6.4 Recuperação de larvas

As larvas recuperadas dos camundongos dos Grupos I, II e III são mostradas na Figura 23. A tabela 6 mostra a quantidade de larvas recuperadas em cada órgão, por grupo e data pós-infecção.

Figura 23. Larvas de *T. canis* encontradas em fígado, carcaça e cérebro dos camundongos dos grupos infectados. I - animais infectados com 5 ovos larvados; II - animais infectados com 50 ovos larvados; III - animais infectados com 500 ovos larvados

Tabela 6. Média $\pm$ desvio padrão e percentual de recuperação de larvas nos grupos I, II e III, ao final do experimento

	Carcaça	Fígado	Cérebro	Total
Grupo I	0,33 $\pm$ 0,51 (6,67%)	0 $\pm$ 0 (0,00%)	0,16 $\pm$ 0,40 (3,33%)	0,50 $\pm$ 0,83 (10,00%)
Grupo II	4,00 $\pm$ 1,72 (8,33%)	0 $\pm$ 0 (0,00%)	3,00 $\pm$ 2,00 (6,00%)	7,16 $\pm$ 2,13 (14,33%)
Grupo III	18,50 $\pm$ 15,14 (4,37%)	0,50 $\pm$ 0,54 (0,10%)	13,00 $\pm$ 3,66 (2,67%)	35,67 $\pm$ 17,75 (7,13%)

A tabela 6 revela o aumento da recuperação larvária em números absolutos à medida em que se aumenta a carga parasitária. Assim, na carcaça e no cérebro, foram encontradas mais larvas no grupo III do que no grupo I e II, exceto no fígado, em que o número de larvas encontradas foi mínimo.

No percentual total de recuperação larvária, entretanto, o grupo II surpreendentemente apresenta maior porcentagem de recuperação em

comparação aos outros grupos, e o mesmo foi observado no percentual individual em cada órgão estudado. Igualmente aos números absolutos, exclui-se somente o fígado, em que o percentual de larvas recuperadas é menor que 1% nos três grupos de animais infectados.

7. DISCUSSÃO

Modelos murinos se tornaram importantes para o estudo de processos do sistema imune, particularmente os mediados por anticorpos, e sua aplicação diagnóstica. Experimentos em camundongos têm fornecido, ao longo dos anos, evidências que anticorpos, especialmente da classe IgG, agem como mediadores potentes da resposta imune protetora contra a infecção por helmintos, especialmente na toxocaríase (Harris e Gause, 2011). O teste ELISA indireto permite comparar a dinâmica de anticorpos anti-*Toxocara* em relação ao curso da infecção e a dosagem de ovos inoculados.

Desde a descrição por De Savigny (1975) do uso do TES-Ag para o diagnóstico sorológico da toxocaríase, diversos autores passaram a utilizá-lo, ao lado de empresas de insumos diagnósticos, que desde então comercializam *kits* para a utilização na rotina laboratorial, com 91% de sensibilidade e 86% de especificidade (Jacquier et al. 1991; Fillaux e Magnaval, 2013).

No presente trabalho, foi observada a relação diretamente proporcional entre a detecção de anticorpos e a dose inoculada nos animais, já constatada por Kayes et al. (1985) e Havasiová-Reiterová et al. (1995). Bowman et al. (1987) demonstraram a relação entre a concentração antigênica no soro, a dosagem de ovos inoculados e a detecção de anticorpos IgG em camundongos experimentalmente infectados. Os resultados desses autores ratificam os achados do presente estudo, em que foram observados altos níveis de anticorpos IgG anti-*Toxocara* nos grupos II e III e baixos níveis nos animais do grupo I durante o curso da infecção.

A dinâmica da produção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* detectados nos grupos II e III sugere que a técnica de ELISA detectou quantidades similares desses anticorpos nos dois grupos durante o período estudado. Em uma infecção maciça, a ativação do sistema imune não induzirá à produção de anticorpos além o observado nesses grupos, devido ao fenômeno de tolerância imunológica.

Embora não tenha havido relevância estatística entre o grupo I e o grupo controle, níveis de IgG foram detectados acima do *cut-off* em até 50% dos animais do grupo I aos 60 e 120 dpi. Ainda que a migração de larvas não tenha sido estudada em cada data após infecção, a variação observada nos níveis de anticorpos neste grupo no decorrer do experimento possivelmente seja explicada pelo padrão de migração das mesmas. As larvas migram pela corrente sanguínea e tecidos, às vezes de forma contínua, seguindo um padrão errático de movimentação, até seu encapsulamento em granulomas (Abo-Shehada & Herbert, 1984; Kayes et al. 1985; Havasiová-Reiterová et al. 1995; Cookston et al. 1990; Othman et al. 2011). Dessa maneira, o ELISA pode exibir níveis baixos de anticorpos que são, geralmente, constantes. Provavelmente, o sequestro das larvas em granulomas nos diversos órgãos levou à diminuição dos níveis de anticorpos revelados pelo ELISA aos 30 e 90 dpi.

Ainda, há probabilidade de a larva migrar para sítios em que fique protegida do sistema imune, como olhos e SNC, sobretudo quando o animal é inoculado com baixas cargas parasitárias, como observado no grupo I. No presente estudo, larvas foram recuperadas no cérebro dos animais inoculados com cinco ovos larvados, sítio onde a resposta imune está, provavelmente, reduzida (Dunsmore et al. 1983). Alguns estudos mostram que o teste ELISA no soro revela títulos mais baixos no momento em que as larvas migram para o SNC, reafirmando os resultados observados neste experimento (Holland et al. 2015; Goffette et al. 2000).

A dinâmica dos anticorpos IgG anti-*Toxocara*, observada durante o curso da infecção, revelou menor detecção dos mesmos no início do experimento. Nesta fase, observa-se uma resposta imunológica em formação contra o parasito nos animais de todos os grupos, especialmente nos grupos II e III; os soros dos animais do grupo I mantiveram-se não reagentes, comportamento similar aos animais do grupo controle. Kayes et al. (1985), Novák et al. (2017) e Havasiová-Reiterová et al. (1995) observaram a mesma dinâmica em grupos inoculados com alta carga parasitária, e Havasiová-Reiterová et al. (1995) relataram uma fraca resposta imune em animais inoculados com cinco e sete ovos larvados, resultando em baixa detecção de anticorpos anti-*Toxocara*.

Os grupos infectados mostraram maiores níveis de IgG aos 60 dpi., resultados similares aos obtidos por Morales et al. (2002) na mesma data pós-infecção, por Havasiová-Reiterová et al. (1995) aos 56 dpi. em camundongos C57BL6/J, por Chieffi et al. (1995) no 50º dpi. em camundongos BALB/c, por Cuéllar & Rodríguez (1990) na nona semana de infecção e por Kayes et al. (1985) da segunda até a quarta semana em animais inoculados com alta carga parasitária.

Posteriormente, aos 90 dpi., a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* apresentou uma discreta variação nos grupos inoculados com maior carga parasitária. Cuéllar & Rodríguez (1990) observaram resultados similares ao relatarem uma pequena diminuição na detecção de anticorpos a partir da nona semana, sem alterar o resultado reagente do teste ELISA, sugerindo que esta data pode ser a mais adequada para o diagnóstico da toxocaríase experimental. Contudo deve-se considerar que, na prática clínica, é difícil, senão impossível, saber com segurança quando um paciente ou outro hospedeiro paratênico foi infectado.

O WB, junto ao ELISA, é atualmente uma ferramenta de imunodiagnóstico utilizada na detecção de anticorpos anti-*Toxocara* (Chieffi et al. 2009a). O TES-Ag é complexo, composto por diversas glicoproteínas, e seu fracionamento promovido pela técnica de SDS-PAGE permitiu que esta última apresentasse maior especificidade (Zibaei et al. 2013a).

Na análise do perfil eletroforético do antígeno, foram observadas bandas de 90-15 kDa em SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Sarimehmetoğlu et al (2001) descreveram bandas entre 97-6.1kDa, e Elefant et al. (2006) de 120-27 kDa em SDS-PAGE 10% corado com nitrato de prata. Iddawella et al. (2007) relataram 11 bandas entre 280 a 28 kDa, utilizando SDS-PAGE 10% e *Coomassie Blue* como corante, e Mendonça et al. (2013) observaram bandas de 104-13 kDa em gel SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Blue*. As discretas variações entre as bandas descritas pelos autores e as observadas no presente estudo podem ter ocorrido devido a alterações no pH e temperatura durante a obtenção do antígeno.

Magnaival et al. (1991), ao desenvolverem o WB para toxocaríase, descreveram um padrão de bandas que foram agrupadas em bandas de baixa (35, 30, 28 e 24 kDa) e alta massa molecular (200, 147 e 132 kDa) e consideraram as bandas entre 35-24 kDa como específicas para toxocaríase; bandas acima de 100 kDa podem indicar com reações cruzadas com outros antígenos parasitários. Em camundongos Swiss albinos inoculados com 1500 ovos larvados, Sarimehmetoğlu et al (2001) descreveram, além das bandas de 34-28 kDa, uma banda de 40 kDa.

A relação diretamente proporcional entre inóculo de ovos larvados e resultados reagentes, bem como a intensidade de bandas, também é claramente evidente ao utilizarmos o WB, uma vez que bandas de baixa massa molecular observadas nos animais dos grupos II e III são muito mais intensas durante o curso do experimento; isso está de acordo com Fenoy et al. (2008), que também relataram bandas mais intensas em animais inoculados 200 e 1000 ovos larvados.

No início, somente os grupos II e III mostraram bandas de baixa massa molecular. Boyce et al. (1988), relataram maior número de bandas presentes somente após 30 dpi. em comparação aos 14 dpi.; Fenoy et al. (2008) relataram bandas de alta e baixa massa molecular em camundongos BALB/c com alta e baixa carga parasitária a partir dos 40 dpi., e Alba-Hurtado et al. (2009) identificaram uma banda de baixa massa molecular aos 20 dpi. em animais inoculados com alta carga parasitária.

Ainda, nota-se o aumento de bandas entre 100 kDa a 65 kDa à medida em que se prolonga o período da infecção e o inóculo, sugerindo uma relação entre este e tempo de infecção: quanto mais maciça e prolongada a infecção, maiores são as chances dos anticorpos reconhecerem bandas de diferentes massas moleculares. Essa observação está de acordo com o achado de Morales et al. (2002), que observaram o aparecimento de quatro bandas de menor e maior massa molecular no início da infecção, até sete bandas ao final do experimento. Sommerfelt et al. (2006) relataram o aparecimento da banda de 120 kDa em amostras de soro de porcos após 56 dpi., juntamente com duas

outras bandas que se mostraram presentes desde a primeira data pós-infecção analisada; Alba-Hurtado et al. (2009) verificaram um aumento progressivo de bandas entre 200 e 24 kDa dos 20 aos 130 dpi., indicando que esse resultado pode ter ocorrido em função da migração das larvas pelos tecidos e/ou pelos metabólitos liberados no momento em que são mortas pelo sistema imune. Estes autores enfatizaram a utilidade da observação de sucessivas bandas de diferentes massas moleculares no reconhecimento do período após infecção. Os resultados dos autores supracitados estão de acordo com o observado nos animais dos Grupos II e III do presente trabalho, no qual a relação entre o aparecimento de bandas de alta massa molecular e o tempo de infecção está associada a animais inoculados com uma alta carga parasitária. No entanto, a maioria dos pacientes, especialmente aqueles com a síndrome da TO, frequentemente apresentam infecções por baixa carga parasitária (Fillaux e Magnaval, 2013; Macpherson, 2013). Assim, os resultados dos autores supracitados referem-se somente ao observado nos animais dos grupos II e III do presente trabalho.

As bandas de 40, 35 e 30 kDa foram as mais frequentes nos animais de todos os grupos, presentes nos grupos II e III a partir de 30 dpi., e em todos os grupos infectados a partir de 60 dpi.

A banda de 30 kDa faz parte do Tc-CTL-1 ou TES-32, com massa molecular de 32 kDa, que é o constituinte proteico de superfície mais abundante da larva infectante de *T. canis* (Loukas et al. 1999a). Pesquisadores relataram a presença da Tc-CTL-1 em seus resultados como de importância diagnóstica. Levando em consideração as pequenas diferenças na preparação do antígeno, o Tc-CTL-1 pode ser detectado em valores aproximados a 30 kDa (Magnaval et al. 1991; Sarimehmetoğlu et al. 2001; Morales et al. 2002; Alba-Hurtado et al. 2009; Roldán e Espinoza, 2009; Bellanger et al. 2010; Elefant et al. 2011; Zibaei et al. 2013a; Zhan et al. 2015; Roldán et al. 2015; Rudzińska et al. 2017; Nguyen et al. 2017).

Além da banda de 30 kDa, as bandas de 40 e 35 kDa foram também frequentes nos grupos I, II e III no curso da infecção. A banda de 35 kDa faz parte das aquaporinas, descrita inicialmente por Loukas et al. (1999b), nomeada

Tc-aqp-1. Aquaporinas são descritas como canais de água com importante função nos nematódeos, incluindo as formas juvenis, pois estes precisam se adaptar a diferentes pressões hidrostáticas. A Tc-aqp-1 apresenta homologia com aquaporinas principalmente de *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* e aquaporina-3 humana (Loukas et al. 1999b). A Tc-aqp-1 também participa do complexo mecanismo de evasão do sistema imune (Zhu et al. 2015).

A banda de 40 kDa, descrita por Loukas et al. (2000), apresenta massa molecular próxima da Tc-MUC-1, parte do TES-120, que tem massa molecular de 120 kDa em SDS-PAGE (Loukas et al. 2000). Devido à sua extensa glicosilação, a mobilidade Tc-MUC-1 no gel não corresponde a sua real massa molecular (Maizels et al. 2006). Pela alta frequência dessa banda nos animais infectados no atual estudo, a banda de 40kDa pode ser melhor explorada em estudos futuros a fim de analisar sua importância diagnóstica na toxocaríase.

A banda de 45 kDa apresentou frequência inconstante nos grupos infectados no decorrer do experimento, independente da carga parasitária ou data após infecção, não demonstrando importância aparente. Esta pertence ao grupo das mucinas, particularmente à Tc-MUC-3, também descrita por Loukas et al. (2000).

A banda intermediária de 65 kDa foi identificada em todos os grupos infectados a partir dos 60 dpi. Roldán e Espinoza (2009) também observaram bandas de 67 e 56 kDa em amostras de soro de humanos com toxocaríase e outras parasitoses. Lescano et al. (2012) observaram bandas de 66 kDa em camundongos BALB/c co-infectados com *T. canis* e *Ascaris suum* aos 70 dpi., próximo da data em que a banda de 65 kDa foi observada neste estudo, não podendo ser considerada uma banda com alta especificidade para o diagnóstico desta infecção. No presente trabalho, a banda de 65 kDa teve frequência notória em todos os grupos de animais infectados a partir do 60 dpi., e mais estudos devem ser realizados para entender sua real importância diagnóstica.

São poucos os relatos na literatura que relacionam diferentes inóculos e duração da infecção utilizando a técnica de WB (Fenoy et al. 2008); o presente estudo contribuiu com a observação de pontos importantes sobre a dinâmica de anticorpos e o aprimoramento dessa ferramenta diagnóstica.

A PCR convencional é uma técnica de biologia molecular amplamente utilizada para o diagnóstico de diferentes doenças parasitárias, e mostrou-se uma boa ferramenta para estudos epidemiológicos da toxocaríase (Suzuki et al, 2006; Durant et al, 2012; Sitta et al, 2014; Khademvatan et al, 2014).

Em sua revisão, Zhu et al. (2001) destacaram a importância dos espaçadores transcritos internos (ITS) nos estudos taxonômicos e diagnósticos dos nematoides, especialmente da superfamília Ascaridoidea, incluindo *T. canis*. Poucos anos antes, Jacobs et al. (1997) descreveram um par de *primers* a partir do ITS-2, que se mostravam específicos para *T. canis*, e que foram utilizados no presente estudo para fins diagnósticos em amostras de soro e órgãos de camundongos BALB/c inoculados com três diferentes dosagens de ovos larvados.

Eram esperados neste estudo, a amplificação do DNA específico do parasito nas amostras de soro em quaisquer datas pós-infecção estudadas, levando em conta o padrão de migração larvária, bem como os relatos prévios de migração larvária contínua (Abo-Shehade e Herbert, 1984; Cooskton et al. 1990; Magnaval et al. 2001; Othman et al. 2011; Strube et al. 2013). Entretanto, nas condições deste experimento, não foi possível detectar o DNA do parasito nas amostras de soro dos animais infectados. Este resultado sugere a ausência de DNA de *T. canis* nas amostras de soro dos animais infectados, provavelmente pela pequena liberação de DNA durante a migração larvária, mesmo considerando a rápida excreção da sua camada exterior da larva (Maizels et al. 2013). Ao utilizar o *primer* universal, todas as amostras apresentaram amplificação de DNA, o que reforça a ausência de DNA específico do parasito nessas amostras.

Ainda, levando-se em conta que a quantidade de DNA liberada pelo parasito é possivelmente pequena, é provável que as amostras de soro contenham menos de 1 ng/ μ L de DNA de larvas de *T. canis*, não detectado pela PCR convencional. Uma meta-análise de métodos moleculares para a detecção de DNA de *Strongyloides stercoralis* em amostras de humanos, incluindo a PCR convencional, apresentou resultados similares. Os autores mostraram que esses

métodos apresentam sensibilidade de 61,8% quando comparado às técnicas imunológicas (Buonfrate et al. 2018).

Utilizando os *primers* Jacobs e Durant, o DNA do parasito foi detectado no fígado, carcaça e cérebro de animais dos três grupos infectados, principalmente nos grupos II e III. A PCR convencional em amostras de fígado resultou em bandas de difícil visualização, além de bandas de aproximadamente 300pb.

A presença de bandas inespecíficas observadas no DNA obtido das amostras de tecidos pode estar relacionada com a inespecificidade dos *primers*, ou ainda com a pequena quantidade de DNA específico presente nas amostras. Diante desses resultados, é importante a utilização de novos *primers* com o intuito de aperfeiçoar o diagnóstico molecular da toxocaríase murina experimental.

Os achados do presente trabalho concordam com estudos já realizados em órgãos de outros animais. Zibaei et al. (2016) observaram amplificação de DNA específico ao realizar a PCR convencional em larvas isoladas de fígado, duodeno, diafragma e cérebro de galinhas. Borecka e Gawor (2008a) observaram o mesmo em amostras de fígado de gerbilos infectados com 1000 ovos larvados de *T. canis*. Rai et al. (1997), avaliando amostras de fígado de camundongo ICR inoculados com 1000 e 10.000 ovos larvados, relataram positividade na primeira PCR; após uma segunda PCR com os produtos amplificados, foi demonstrada amplificação específica nas amostras de animais inoculados com 10 ovos larvados. No entanto, é válido ressaltar que neste estudo foram utilizados *primers* diferentes ao presente trabalho.

Dos poucos trabalhos que estudaram a PCR convencional em órgãos, somente Borecka e Gawor (2008a) e Krücken et al. (2017) utilizaram amostras aleatórias de órgãos para a detecção de DNA de *T. canis* à semelhança do realizado nesse trabalho. Contudo, estudos dessa natureza são escassos e precisam ser aprofundados a fim de melhor compreensão.

Possivelmente, a PCR convencional em amostras de órgãos possa ser utilizada em casos de diagnóstico diferencial com outras parasitoses que

possam apresentar granulomas eosinofílicos, a exemplo da anisaquíase (Mattiucci et al. 2017).

Diversos estudos mostraram que a migração das larvas de *T. canis* em camundongos é dependente da linhagem do animal, inóculo e tempo após infecção. A linhagem BALB/c se mostrou mais susceptível que outras devido à melhor recuperação das larvas em órgãos como cérebro. Ademais, sua sobrevivência ao longo do tempo, mesmo quando altamente parasitado, legitima a sua utilização no presente estudo (Bardón et al. 1994; Epe et al. 1994; Strube et al. 2013). No presente estudo, larvas foram encontradas em todos os órgãos estudados, exceto no fígado, o que pode indicar que, no momento da eutanásia, as larvas estivessem na fase miotrópica-neurotrópica.

A grande afinidade da larva de *T. canis* pelo cérebro relatada por outros pesquisadores também foi observada neste estudo, embora em menor intensidade (Cuéllar et al. 1990; de Valle Guardis et al. 2002; Lescano et al. 2004; Janecek et al. 2014). Isto pode ocorrer devido ao cérebro ser um sítio menos sujeito à ação do sistema imune, como descrito por Dunsmore et al. (1983); dessa maneira, há uma menor possibilidade das larvas permanecerem contidas em um granuloma, como ocorre em outros órgãos.

A recuperação de larvas, juntamente com as técnicas de ELISA, WB e PCR convencional, revelou pontos importantes relacionados à natureza migratória deste parasito, mostrando um amplo panorama da dinâmica de anticorpos IgG.

No atual estudo, não foram recuperadas larvas no fígado, embora tenha ocorrido amplificação específica de DNA nesse órgão. Os resultados positivos da PCR ao final do experimento indicam nova migração larvária para o fígado em uma porcentagem dos animais. Estes resultados sugerem que a migração larvária de *T. canis* apresenta dois padrões: o primeiro é dividido entre as fases visceral e miotrópica-neurotrópica, como descrito por Abo-Shehada e Herbert (1984); o segundo é subdividido entre a fase miotrópica-neurotrópica e um padrão de migração contínua, que provavelmente ocorre de forma simultânea.

A recuperação de larvas obtida neste estudo foi essencial para o entendimento de como os anticorpos anti-*Toxocara* e o DNA do parasito podem ou não ser detectados pelas técnicas utilizadas. O padrão de migração larvária nos camundongos BALB/c pode estar ligado à detecção de anticorpos, já que intermitência dos seus níveis foi identificada pelo teste ELISA. Além disso, a recuperação de larvas permitiu confirmar a infecção dos animais, especialmente quando se analisa os resultados negativos da PCR convencional nas amostras de soro.

Em conclusão, nas condições deste estudo, o método de biologia molecular utilizado não substituiu as técnicas imunológicas.

Comparando as técnicas de ELISA e de WB, foi observado um aumento gradual na detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara*, e um grande aumento na frequência de reconhecimento de bandas. Adicionalmente, os resultados do presente estudo abordam uma importante questão relacionada aos anticorpos residuais e técnicas imunológicas, especialmente nos animais inoculados com baixa carga parasitária. Não é claro se os baixos níveis de IgG detectados pelo ELISA, juntamente com o desaparecimento de bandas importantes no WB ao longo do experimento, são resultados de uma infecção passada, com consequente detecção de anticorpos residuais ou, se as larvas de uma primoinfecção ainda estão vivas, encapsuladas em granulomas, liberando pequenas quantidades de TES-Ag.

Este estudo teve como principal limitação o pequeno número de animais. Dessa forma, um estudo com maior quantidade de animais poderia auxiliar a desvendar as questões propostas, dentre as quais se destacam a dinâmica de anticorpos anti-*Toxocara*, a detecção de DNA parasitário nos tecidos, e a associação com a migração larvária, em cada data pós-infecção. Ainda, esta medida permitiria a análise individual dos soros dos animais pela técnica de PCR convencional. Certamente, são necessários mais estudos utilizando técnicas de biologia molecular, como por exemplo, o PCR quantitativo.

É importante destacar que este é o primeiro estudo aplicando a PCR convencional em amostras de soro para o diagnóstico da toxocaríase murina

experimental, comparando não só a técnicas imunológicas bem estabelecidas, mas também ao método de recuperação de larvas.

8. CONCLUSÕES

- As técnicas de ELISA e WB continuam sendo as melhores para o diagnóstico desta doença.
- O método de WB apresentou melhores resultados em relação ao ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* para animais inoculados com baixa carga parasitária.
- A banda de 30 kDa foi frequentemente reconhecida ao longo da toxocaríase murina experimental.
- Não houve amplificação específica de DNA do parasito pela técnica de PCR convencional nas amostras de soro dos animais experimentalmente infectados.

9. REFERÊNCIAS

- Abo-Shehada MN, Herbert I V. The migration of larval *Toxocara canis* in mice II. Post-intestinal migration in primary infections. *Vet Parasitol.* 1984a;17(1):75–83
- Alba-Hurtado F, Tórtora PJL, Tsutsumi V, Ortega-Pierres MG. Histopathological investigation of experimental ocular toxocariasis in gerbils. *Int J Parasitol.* 2000;30(2):143–7.
- Alba-Hurtado F, Muñoz-Guzmán MA, Valdivia-Anda G, Tórtora JL, Ortega-Pierres MG. *Toxocara canis*: Larval migration dynamics, detection of antibody reactivity to larval excretory-secretory antigens and clinical findings during experimental infection of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Exp Parasitol.* 2009;122(1):1–5.
- Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):375–88.
- Anderson JP, Rascoe LN, Levert K, Chastain HM, Reed MS, Rivera HN, et al. Development of a Luminex Bead Based Assay for Diagnosis of Toxocariasis Using Recombinant Antigens Tc-CTL-1 and Tc-TES-26. Moreira GS, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(10):e0004168.
- Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitol Res.* 2012;110(2):649–56.
- Bach-Rizzatti, BC. *Desenvolvimento do teste imunoenzimático ELISA para o diagnóstico da toxocaríase humana* [tese]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Uiversidade de São Paulo; 1984.
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL. Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminthol.* 1994;68(4):359–60.
- Baermann G. Eine Einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel Mit h. Geneesk. *Laboratories Weltvreden Feestbundel.* 1917,41-7.

Beautyman W, Woolf AL. An ascaris larva in the brain in association with acute anterior poliomyelitis. *J Pathol Bacteriol.* 1951;63(4):635–47.

Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. Chronic Eosinophilia Due To Visceral Larva Migrans. *Pediatrics.* 1952;9(1):7–19.

Bellanger AP, Humbert P, Gavignet B, Deschaseaux AD, Barisien C, Roussel S, et al. Comparative assessment of enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot for the diagnosis of toxocariasis in patients with skin disorders. *Br J Dermatol.* 2010;162(1):80–2.

Bin LLC, Santarém VA, Laposy CB, Rubinsky-Elefant G, Roldán WH, Giuffrida R, et al. Kinetics and avidity of anti-*Toxocara* antibodies (IgG) in rabbits experimentally infected with *Toxocara canis*. *Rev Bras Parasitol Veterinária.* 2016;25(1):99–104.

Boldiš V, Ondriska F, Špitalská E, Reiterová K. Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol.* 2015;159:252–8.

Borecka A, Gawor J. Modification of gDNA extraction from soil for PCR designed for the routine examination of soil samples contaminated with *Toxocara* spp. eggs. *J Helminthol.* 2008b;82(2):119–22.

Borecka A, Gawor J, Niedworok M, Sordyl B. Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Helminthologia.* 2008a;45(3):147–9

Bowman DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1987;36(1):75–82.

Boyce WM, Branstetter BA, Kazacos KR. Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of *Baylisascaris procyonis*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum* by Western blotting and enzyme immunoassay. *Int J Parasitol.* 1988;18(1):109–13.

Buonfrate D, Requena-Mendez A, Angheben A, Cinquini M, Cruciani M, Fittipaldo A, et al. Accuracy of molecular biology techniques for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection - A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2):e0006229.

Caballero-Garcia ML, Jimenez-Cardoso E. Early detection of *Trichinella spiralis* infection by the polymerase chain reaction in blood samples of experimentally infected mice. *Parasite.* 2001;17(8):S229–31.

Caldera F, Burlone ME, Genchi C, Pirisi M, Bartoli E. *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection.* 2013;41(3):691–4.

Capuano DM, Rocha G de M. Environmental contamination by *Toxocara* sp. eggs in Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47(4):223–6.

Cassenote AJF, Pinto Neto JM, Lima-Catelani AR de A, Ferreira AW. Contaminação do solo por ovos de geo-helmintos com potencial zoonótico na municipalidade de Fernandópolis, Estado de São Paulo, entre 2007 e 2008. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):371–4.

CDC. CDC - DPDx - Toxocariasis - Gallery [Internet]. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/toxocariasis/gallery.html>

CDC. CDC - Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs) in the United States [Internet]. 2016. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/npi/>

Chieffi PP, Dos Santos SV, De Queiroz ML, Zevallos Lescano SA. Human toxocariasis: Contribution by Brazilian researchers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009a;51(6):301–8.

Chieffi PP, Aquino RTR, Paschoalotti MA, Ribeiro MCSA, Nasello AG. Muscular strength decrease in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009b;51(2):73–5.

Chieffi PP, Peres BA, Mello EO de, Kanamura H, Brandão MM. Persistence of specific antibody response in different experimental infections of mice with *Toxocara canis* larvae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37(3):187–90

Chieffi PP, Aquino RTR, Pasqualotti MA, Ribeiro MCSA, Nasello AG. Behavioral changes in *Rattus norvegicus* experimentally infected by *Toxocara canis* larvae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(5):243–6.

Choi D, Lim JH, Choi DC, Lee KS, Paik SW, Kim SH, et al. Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: A cross-sectional study in healthy adults. *Korean J Parasitol*. 2012;50(1):23–7.

Colebunders R, Mandro M, Mokili JL, Mucinya G, Mambandu G, Pfarr K, et al. Risk factors for epilepsy in Bas-Uélé Province, Democratic Republic of the Congo: a case–control study. *Int J Infect Dis*. 2016;49:1–8.

Cookston M, Stober M, Kayes SG. Eosinophilic myocarditis in CBA/J mice infected with *Toxocara canis*. *Am J Pathol*. 1990;136(5):1137–45.

Corral MA, Paula FM, Meisel DMCL, Castilho VLP, Gonçalves EMN, Levy D, et al. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology*. 2017;144(2):124–30.

Cox DM, Holland C V. Influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. *J Helminthol*. 2001;75(1):23–32.

Cuéllar del Hoyo C, Fenoy Rodríguez S. Dinámica de la respuesta humoral en dos cepas murinas. I. Inoculación con huevos embrionados de *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina* y *Ascaris suum*. *Rev Ibérica Parasitol*. 1990;50(1–2):137–50.

Del Valle Guardis M, Radman NE, Burgos L, Fonrouge RD, Archelli SM. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitol Latinoam*. 2002;118(1900):46–9.

De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol*. 1979;32(3):284–8.

De Savigny DH. *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J Parasitol.* 1975;61(4):781–2.

Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(2):265–72.

Doedens A, Loukas A, Maizels RM. A cDNA encoding Tc-MUC-5, a mucin from *Toxocara canis* larvae identified by expression screening. *Acta Trop.* 2001;79(3):211–7.

Dunsmore JD, Thompson RCA, Bates IA. The accumulation of *Toxocara canis* larvae in the brains of mice. *Int J Parasitol.* 1983;13(5):517–21.

Durant J-F, Irenge LM, Fogt-Wyrwas R, Dumont C, Doucet J-P, Mignon B, et al. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. *Parasit Vectors.* 2012;5:288-96.

Dziemian E, Zarnowska H, Kołodziej-Sobocińska M, Machnicka B. Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. *Parasite Immunol.* 2008; 30(3):187–90.

Elefant GR, Roldán WH, Seeböck A, Kosma P. Evaluation of a di-O-methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol.* 2016;38(4):236–43.

Elefant GR, Hoshino-Shimizu S, Jacob CMA, Sanchez MCA, Ferreira AW. Potential immunological markers for diagnosis and therapeutic assessment of toxocariasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2011;53(2):61–5.

Elefant GR, Shimizu SH, Arroyo Sanchez MC, Abe Jacob CM, Ferreira AW. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA, and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Lab Anal.* 2006;20(4):164–72.

Epe C, Sabel T, Schnieder T, Stoye M. The behavior and pathogenicity of *Toxocara canis* larvae in mice of different strains. *Parasitol Res.* 1994;80(8):691–5.

Espinoza YA, Huapaya PE, Roldán WH, Jiménez S, Abanto EP, Rojas CA, et al. Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the Northeast of Lima, Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2010;52(1):31–6.

Espírito-Santo MCC do, Pinto PLS, Mota DJG da, Gryscek RCB. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013;55(2):129–32.

Fahrion AS, Schnyder M, Wichert B, Deplazes P. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? *Veterinary Parasitology.* 2011;177(1).

Fan CK, Holland C V., Loxton K, Barghouth U. Cerebral toxocariasis: Silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3):663–86.

Fan CK, Liao CW, Cheng YC. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):342–52.

Fan CK, Lin YH, Du WY, Su KE. Infectivity and pathogenicity of 14-month-cultured embryonated eggs of *Toxocara canis* in mice. *Vet Parasitol.* 2003;113(2):145–55.

Farmer A, Beltran T, Choi YS. Prevalence of *Toxocara* species infection in the U.S.: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2011–2014. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):e0005818.

Fellrath J-M, Magnaval J-F. Toxocariasis after slug ingestion characterized by severe neurologic, ocular, and pulmonary involvement. *Open forum Infect Dis.* 2014; 1(2):ofu063.

Fenoy S, Rodero M, Pons E, Aguila C, Cuéllar C. Follow-up of antibody avidity in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitology*. 2008;135(6):725–33.

Figueiredo SDP, Taddei JAAC, Menezes JJC, Novo NF, Silva EOM, Cristóvão HLG, et al. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. *J Pediatr*. 2005; 81(2):126–32.

Fillaux J, Magnaval JF. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):327–36.

Fragoso RP, Monteiro MBM, Lemos EM, Pereira FEL. Anti-*Toxocara* antibodies detected in children attending elementary school in Vitoria, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011; 44(4):461–6.

Gallina T, Silva MAMP, Castro LLD, Wendt EW, Villela MM, Berne MEA. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Veterinária*. 2011;20(2):176–7.

Garibyan L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *Jounral Investig Dermatology*. 2013;133:e6.

Gasser RB. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):353–64.

Gems D, Ferguson CJ, Robertson BD, Nieves R, Page AP, Blaxter ML, et al. An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem*. 1995;270(31):18517–22.

Gems D, Maizelstt RM. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: The precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Med Sci*. 1996;93:1665–70.

Glickman LT, Magnaval JF, Domanski LM, Shofer FS, Lauria SS, Gottstein B, et al. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am J Epidemiol*. 1987;125(6):1019–34.

Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev.* 1981;3:230–50.

Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TPJ, Bigaignon G, Sindic CJM. Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. *Eur J Neurol.* 2000;7(6):703–6.

Harris N, Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol.* 2011;32(2):80–8

Havasiová-Reiterová K, Tomašovicová O, Dubinský P. Effect of various doses of infective *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs on the humoral response and distribution of larvae in mice. *Parasitol Res.* 1995; 81(1):13–7.

Holland C V. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. *Parasitology.* 2015; 1–14.

Iddawela D, Ehambaram K, Bandara P. Prevalence of *Toxocara* antibodies among patients clinically suspected to have ocular toxocariasis: A retrospective descriptive study in Sri Lanka. *BMC Ophthalmol.* 2017;17(50).

Iddawela RD, Rajapakse RP, Perera NA, Agatsuma T. Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans. *Korean J Parasitol.* 2007; 45(1):19–26.

Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K, Nawa Y. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res.* 2004; 92(1):50–2.

Jacobs DE, Zhu X, Gasser RB, Chilton NB. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. *Acta Trop.* 1997; 68(2):191–200.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(9):1831–5.

Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C. Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasit Vectors*. 2014;7(1):194.

Jarvi, SI; William, Pitt, WC; Farias, ME; Shiels, L; Severino, MG; Howe, KM, et al. Detection of *Angiostrongylus Cantonensis* in the blood and peripheral tissues of wild hawaiian rats (*Rattus rattus*) by a quantitative PCR (qPCR) Assay. *PLOS One*. 2015;10(4): e0123064.

Kagan IG. Serum-Agar Double Diffusion Studies with *Ascaris* Antigens. *J Infect Dis*. 1957;101(1):11–9.

Kagan IG, Jeska EL, Gentzkow CJ. Serum-agar double diffusion studies with *Ascaris* antigens. II. Assay of whole worm and tissue antigen complexes. *J Immunol*. 1958;80(5):400–6.

Kang EJ, Choi YJ, Kim JS, Lee BH, Kang K-W, Kim HJ, et al. Bladder and liver involvement of visceral larva migrans may mimic malignancy. *Cancer Res Treat*. 2014;46(4):419–24.

Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2008;55(8–10):406–13.

Kayes SG, Oaks JA. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. Initial events. *Am J Pathol*. 1978;93(2):277–94.

Kayes SG, Omholt PE, Grieve RB. Immune responses of CBA/J mice to graded infections with *Toxocara canis*. *Infect Immun*. 1985;48(3):697–703.

Khademvatan S, Abdizadeh R, Tavalla M. Molecular characterization of *Toxocara* spp. from soil of public areas in Ahvaz southwestern Iran. *Acta Trop*. 2014;135(1):50–4.

Khademvatan S, Rahim F, Tavalla M, Abdizadeh R, Hashemitabar M. PCR-Based Molecular Characterization of *Toxocara* spp. Using Feces of Stray Cats: A Study from Southwest Iran. *PLoS One*. 2013;8(6):e65293.

Krause M, Hirsh D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell*. 1987;49(6):753–61.

Krücken J, Blümke J, Maaz D, Demeler J, Ramünke S, Antolová D, et al. Small rodents as paratenic or intermediate hosts of carnivore parasites in Berlin, Germany. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172829.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5.

Lassmann B, Tsigrelis C, Virk A. 33-Year-Old Woman With Marked Eosinophilia. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(1):103–6.

Lee RM, Moore LB, Bottazzi ME, Hotez PJ. Toxocariasis in North America: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(8):e3116.

Lescano SAZ, Nakhle MC, Ribeiro MCS, Chieffi PP. IgG Antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012;54(3):145–52.

Lescano SZ, Queiroz ML, Chieffi PP. Larval recovery of *Toxocara canis* in organs and tissues of experimentally infected *Rattus norvegicus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(6):627–8.

Li MW, Lin RQ, Chen HH, Sani RA, Song HQ, Zhu XQ. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes*. 2007;21(5–6):349–54.

Liao C-W, Sukati H, D’Lamini P, Chou C-M, Liu Y-H, Huang Y-C, et al. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among children in Swaziland, southern Africa. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010;104(1):73–80.

Lim SJ, Lee SE, Kim S, Hong S-H, Sung YM, Kwon OW, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* among Patients with Uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2014;22(5):360–6.

Lloyd S, Amerasinghe PH, Soulsby E JL. Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. *J Small Anim Pract*. 1983;24(4):237–47.

Loukas A, Hintz M, Linder D, Mullin NP, Parkinson J, Tetteh KKA, et al. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem*. 2000;275(50):39600–7.

Loukas A, Mullin NP, Tetteh KKA, Moens L, Maizels RM. A novel C-type lectin secreted by a tissue-dwelling parasitic nematode. *Curr Biol*. 1999a;9(15):825–8.

Loukas A, Hunt P, Maizels RM. Cloning and expression of an aquaporin-like gene from a parasitic nematode. *Mol Biochem Parasitol*. 1999b; 99(2):287–93.

Luzio Á, Belmar P, Troncoso I, Luzio P, Jara A, Fernández Í. Formas parasitarias de importancia zoonótica, encontradas en heces de perros recolectadas desde plazas y parques públicos de la ciudad de Los Ángeles, Región del Bío Bío, Chile. *Rev Chil infectología*. 2015;32(4):403–7.

Lynch NR, Wilkes LK, Hodgen AN, Turner KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol*. 1988;10(3):323–37.

Ma G, Holland C V, Wang T, Hofmann A, Fan C-K, Maizels RM, et al. Human toxocariasis. *Lancet Infect Dis*. 2017.

Macpherson CNL. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int J Parasitol*. 2013;43(12–13):999–1008.

Macuhova K, Akao N, Fujinami Y, Kumagai T, Ohta N. Contamination, distribution and pathogenicity of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs from sandpits in Tokyo, Japan. *J Helminthol*. 2013;87(3):271–6.

Magnaaval J-FF, Fabre R, Maurières P, Charlet J-PP, de Larrard B. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res*. 1991;77(8):697–702.

Magnaaval J-F, Glickman LT. Management and treatment options for human Toxocariasis. In: Holland C V, Smith H, editors. *Toxocara: the enigmatic parasite*. CABI Publishing; 2006. p. 113–26.

Magnaaval JF, Glickman LT, Dorchie P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 2001; 39(1): p. 1–11.

Maizels RM. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):365–74.

Maizels RM, Savigny D De, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol*. 1984;6(1):23–37.

Maizels R., Schabussova I, Callister DM, Nicoll G. Molecular Biology and Immunology of *Toxocara canis*. In: Holland C., Smith H V., editors. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CABI Publishing; 2006. p. 3–17.

Maizels RM, Tetteh KKA, Loukas A. *Toxocara canis*: Genes expressed by the arrested infective larval stage of a parasitic nematode. *Int. J Parasitol*. 2000; 30(1):495–508.

Maleki B, Khorshidi A, Gorgipour M, Mirzapour A, Majidiani H, Foroutan M. Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in soil of public areas in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Alexandria J Med*. 2017.

Mattiucci S, Paoletti M, Colantoni A, Carbone A, Gaeta R, Proietti A, et al. Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):530.

Mendonça LR, Figueiredo CA, Esquivel R, Fiaccone RL, Pontes-de-Carvalho L, Cooper P, et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. *Acta Trop*. 2013;128(1):90–5.

Mohamad S, Azmi NC, Noordin R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1712–7.

Morales OL, López MC, Nicholls RS, Agudelo C. Identification of *Toxocara canis* antigens by western blot in experimentally infected rabbits. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(4):213–6.

Moreira GMSG, Telmo P de L, Mendonça M, Moreira ÂN, McBride AJA, Scaini CJ, et al. Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol*. 2014;30(9):456–64.

Morgan ER, Azam D, Pegler K. Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):390–7.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 (Pt 1):263–73.

Muñoz-Guzmán MA, del Río-Navarro BE, Valdivia-Anda G, Alba-Hurtado F. The increase in seroprevalence to *Toxocara canis* in asthmatic children is related to cross-reaction with *Ascaris suum* antigens. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2010;38(3):115–21.

Negri EC, Santarém VA, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida R. Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: Serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(3):211–6.

Nguyen HH, Vo DT, Thai TTT, Le TTT, Le TD, Hoang NS. The 33.1 kDa excretory/secretory protein produced by *Toxocara canis* larvae serves as a potential common biomarker for serodiagnosis of toxocariasis in paratenic animals and human. *Iran J Parasitol*. 2017;12(1):69–82.

Nichols RL. The Etiology of Visceral Larva Migrants: I. Diagnostic Morphology of Infective Second-Stage *Toxocara* Larvae. *J Parasitol*. 1956;42(4 Section 1):349–62.

Nielsen BL, Brown LR. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 1984;141(2):311–5.

Novák J, Panská J, Macháček T, Kolářová L, Horák P. Humoral response of mice infected with *Toxocara canis* following different infection schemes. *Acta Parasitol.* 2017;62(4):823–35.

Otero D, Alho AM, Nijse R, Roelfsema J, Overgaauw P, Madeira LC, et al. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *J Infect Public Health.* 2017;203(0):87–90.

Othman AA. Therapeutic battle against larval toxocariasis: Are we still far behind? *Acta Trop.* 2012 Dec;124(3):171–8.

Othman AA, El-Shourbagy SH, Soliman RH. Kinetics of Foxp3-expressing regulatory cells in experimental *Toxocara canis* infection. *Exp Parasitol.* 2011;127(2):454–9.

Overgaauw PAM, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):398–403.

Overgaauw PAM, van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, et al. Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Vet Parasitol.* 2009;163(1–2):115–22.

Page AP, Rudin W, Fluri E, Blaxter ML, Maizels RM. *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. *Exp Parasitol.* 1992;75(1):72–86.

Pinelli E, Brandes S, Dormans J, Fonville M, Hamilton CM, der Giessen J van. *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 2007;115(1):76–82.

Pinelli E, Domans J, Die I V. *Toxocara* and Asthma. In: Smith H V., Holland CV, editors. *Toxocara*, The Enigmatic Parasite. CABI Publishing; 2006. p. 42–57.

Pinelli E, Roelfsema JH, Brandes S, Kortbeek T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. *Vet Parasitol.* 2013;193(4):337–41.

Poulsen CS, Skov S, Yoshida A, Skallerup P, Maruyama H, Thamsborg SM, et al. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* - is it possible? *Parasite Immunol.* 2015;37(4):204–7.

Qualizza R, Incorvaia C, Grande R, Makri E, Allegra L. Seroprevalence of IgG anti-*Toxocara* species antibodies in a population of patients with suspected allergy. *Int J Gen Med.* 2011;4:783.

Quattrocchi G, Nicoletti A, Marin B, Bruno E, Druet-Cabanac M, Preux PM. Toxocariasis and Epilepsy: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(8):e1775.

Qvarnstrom Y, Xayavong M, da Silva ACA, Park SY, Whelen AC, Calimlim PS, et al. Real-Time Polymerase Chain Reaction Detection of *Angiostrongylus cantonensis* DNA in Cerebrospinal Fluid from Patients with Eosinophilic Meningitis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(1):176–81.

Rai SK, Uga S, Wu Z, Takahashi Y, Matsumura T. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of toxocariasis: an experimental study. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1997;28(3):541–4.

Ransom B, Foster W. Observations on the life history of *Ascaris lumbricoides*. *US Dep Agric.* 1920;817:1–45.

Rodríguez-Caballero A, Martínez-Gordillo M, Medina-Flores Y, Medina-Escutia M, Meza-Lucas A, Correa D, et al. Successful capture of *Toxocara canis* larva antigens from human serum samples. *Parasit Vectors.* 2015;8(1):264.

Roldán WH, Elephant GR, Ferreira AW. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human toxocariasis. *Parasite Immunol.* 2015;37(11):557–67.

Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(3):411–8.

Rubinsky-Elefant G, Hirat CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systematic and ocular forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2010; 104:3-23.

Rudzińska M, Kowalewska B, Sikorska K. Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol*. 2017;39(1):e12400.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977;74(12):5463–7.

Sarimehmetoğlu HO, Burgu A, Aycicek H, Gönenç B, Tanyuksel M, Kara M. Application of western blotting procedure for the immunodiagnosis of visceral larva migrans in mice by using excretory/secretory antigens. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2001;108(9):390–2.

Schacher JF. A Contribution to the Life History and Larval Morphology of *Toxocara canis*. *J Parasitol*. 1957;43(6):599–612.

Silva AMG, Chieffi PP, da Silva WLF, Kanashiro EHY, Rubinsky-Elefant G, Cunha-Neto E, et al. The hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model of toxocariasis: histopathological, immunohistochemical, and immunoelectron microscopic findings. *Parasitol Res*. 2015;114(3):809–21.

Sitta RB, Malta FM, Pinho JR, Chieffi PP, Gryscek RCB, Paula FM. Conventional PCR for molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Parasitology*. 2014;1–6.

Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval JF, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol*. 2009;25(4):182–8.

Smith H V., Noordin R. Diagnostic Limitations and Future Trends in the Serodiagnosis of Human Toxocariasis. In: Smith H V., Holland CV, editors. *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. CABI Publishing; 2006. p. 89–112.

Sommerfelt IE, Santillán G, Mira G, Ribicich M, Betti A, De Torres R. *Toxocara canis* infections in a pig model: immunological, haematological and blood biochemistry responses. *J Helminthol*. 2006;80(1):73–7.

Sperotto RL, Kremer FS, Aires Berne ME, Costa de Avila LF, da Silva Pinto L, Monteiro KM, et al. Proteomic analysis of *Toxocara canis* excretory and secretory (TES) proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2017;211:39–47.

Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Vet Parasitol*. 2013;193(4):375–89.

Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Tamotsu K. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int*. 2006;55(3):213–8.

Taylor, Mervyn R. H. Keane CT, O'Connor P, Girdwood RWA, Smith H. Clinical Features of Covert Toxocariasis. *Scand J Infect Dis*. 1987;19:693–6.

Tian JX, O'Hagan S. *Toxocara* polymerase chain reaction on ocular fluids in bilateral granulomatous chorioretinitis. *Int Med Case Rep J*. 2015;8:107–10.

Uparanukraw P, Phongsri S, Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(6):967–73.

Wang W.; Cuttall L.; Bielefeldt-Othmann H.; Inpankaew T.; Owen H.; Traub RJ. Diversity of *Blastocystis* subtypes in dogs in different geographical settings. *Parasit Vectors*. 2013;24(6):215.

Watthanakulpanich D. Diagnostic Trends of Human Toxocariasis. *J Trop Med Parasitol*. 2010;33(1):44–52.

Watthanakulpanich D, Smith H V., Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Trop.* 2008;106(2):90–5.

Wilder HC. Nematode endophthalmitis. *Trans - Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1950;55:99–109.

Xi WG, Jin LZ. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *J Helminthol.* 1998;72(2):183–4.

Ximenes C, Brandão E, Oliveira P, Rocha A, Rego T, Medeiros R, et al. Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014;109(8):978–83.

Yamada M, Shishito N, Nozawa Y, Uni S, Nishioka K, Nakaya T. A combined human case of *Dirofilaria immitis* infection in dorsal subcutaneous tissue and *Anisakis simplex sensu stricto* (s.s.) infection in ventral subcutaneous tissue. *Trop Med Health.* 2017;45(1):26.

Yamasaki H, Araki K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R, et al. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(4):1409–13.

Zhan B, Ajmera R, Geiger SM, Gonçalves MTP, Liu Z, Wei J, et al. Identification of immunodominant antigens for the laboratory diagnosis of toxocariasis. *Trop Med Int Heal.* 2015;20(12):1787–96.

Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB, Jacobs DE. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *J Helminthol.* 2001;75:101–8.

Zhu XQ, Jacobs DE, Chilton NB, Sani RA, Cheng NA, Gasser RB. Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasitology.* 1998;117(2):155–64.

Zhu X-Q, Korhonen PK, Cai H, Young ND, Nejsum P, von Samson-Himmelstjerna G, et al. Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. *Nat Commun*. 2015;6:6145.

Zibaei M, Firoozeh F, Bahrami P, Sadjjadi SM. Investigation of anti-*Toxocara* antibodies in epileptic patients and comparison of two methods: ELISA and Western blotting. *Epilepsy Res Treat*. 2013a;2013:156815.

Zibaei M, Sadjjadi SM, Karamian M, Uga S, Oryan A, Jahadi-Hosseini SH. A comparative histopathology, serology and molecular study, on experimental ocular toxocariasis by *Toxocara cati* in Mongolian gerbils and Wistar rats. *Biomed Res Int*. 2013b;(2013).

Zibaei M, Sadjjadi SM, Maraghi S, Azizi S, Oryan A, Sadjjadi SM, et al. The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. *J Helminthol*. 2016;102(1):1–4.

**APÊNDICE A – Aprovação do comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132.

Ilmo(a) **Dr. Susana Angélica Zevallos Lescano**
(aos cuidados de Susana Zevallos Lescano)

São Paulo, 28 de Janeiro de 2014

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/254 'PCR para detecção de DNA de Toxocara canis em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados, comparação com técnicas imunológicas.'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

APÊNDICE B: Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Toxocaríase murina experimental: Diagnóstico por PCR e comparação com técnicas imunológicas**” protocolo nº 162/15 sob a responsabilidade de **Ronaldo Cesar Borges Gryschek e Gabriela Rodrigues e Fonseca**, apresentado pelo Departamento de Moléstias Infecciosas - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 02.12.15

Vigência do Projeto	Abril/2017
Espécie/linhagem	Material coletado
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	Não se aplica
Sexo	Não se aplica
Origem	Não se aplica

CEUA-FMUSP, 02 de Dezembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

**APÊNDICE C: Termo de Outorga e aceitação de auxílio – FAPESP –
Processo número 2014/07345-6**

Para uso exclusivo da FAPESP Processo: 2014/07345-6 Data impressão: 26/07/2014 09:03:34 Folha: _____ Volume: _____ Rubrica: _____
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS PROCESSO 2014/07345-6	
<p>Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XII, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1980, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.</p>	
1.OUTORGADO:	Susana Angélica Zevallios Lescano CPF: 148.597.588-31 RG: _____
2.Correspondência:	Avenida Doutor Eneás Carvalho de Aguiar 470 - Prédio II, Cerqueira César, São Paulo/SP, CEP 05403-000 suzeles@hotmail.com
3.Instituição Sede:	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo/IMT Universidade de São Paulo/USP
4.Projeto de Pesquisa:	PCR para detecção de DNA de Toxocara canis em amostras de soro de camundongos experimentalmente infectados, comparação com técnicas imunológicas.
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Parasitologia Helminologia de Parasitos
7.Coordenação:	Saúde IV
8.Período da Vigência:	01/07/2014 a 30/06/2016
9.Relatórios Científicos:	30/06/2015, 30/07/2016
10.Prestações de Contas:	30/06/2015, 30/07/2016

APÊNDICE D – Trabalhos apresentados em Congressos

Relação entre Inóculo Parasitário e Resposta imunológica da classe IgG na Toxocaríase murina experimental (XXIV Congresso de Sociedade Brasileira de Parasitologia e XXIII Congresso Latinoamericano de Parasitología, 27 a 31 de Outubro de 2015).

ÁREA TEMÁTICA: HELMINTOLOGIA

P-673

TÍTULO: RELAÇÃO ENTRE INOCULO PARASITÁRIO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA CLASSE IGG NA TOXOCARIASE MURINA EXPERIMENTAL
AUTOR(ES): GABRIELA RODRIGUES E FONSECA, SERGIO VIEIRA DOS SANTOS, PEDRO PAULO CHIEFFI, FABIANA MARTINS DE PAULA, SUSANA ZEVALLOS LESCANO
INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO (LIM 06)

O relacionamento próximo entre o homem e os animais domésticos, aumentou o risco de agressões e transmissão de zoonoses. No caso de cães e gatos, estes podem transmitir helmintíases como a toxocaríase que é causada pelo nematódeo *Toxocara* spp. e provoca diversas síndromes como a *larva migrans* visceral (LMV), *larva migrans* ocular (LMO), toxocaríase oculta (TO) e neurotoxocaríase (NT) cujo diagnóstico depende, na maioria das vezes, da detecção de anticorpos, por meio de técnicas sorológicas. A fim de estudar a dinâmica da resposta de anticorpos da classe IgG, camundongos BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, foram oralmente infectados com 5, 50 e 500 ovos larvados de *Toxocara canis*; além destes, constituiu-se um grupo controle negativo com 7 camundongos não infectados. Aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção (dpi) todos os animais, previamente anestesiados, foram sangrados pelo plexo orbitário. Os soros foram processados pela técnica de ELISA utilizando antígeno de Excreção-Secreção de *T. canis*. O ELISA apresentou-se reagente em todas as datas para a maioria das dosagens de ovos; observou-se relação diretamente proporcional à carga parasitária e a detecção de anticorpos foi mais intensa próximo dos 60 dias após infecção. Neste ensaio melhores resultados foram obtidos na detecção de anticorpos IgG em animais infectados com baixa carga parasitária e próximo do 60 dpi. Ao final do experimento, 170 dpi, efetuou-se a recuperação das larvas, pelo método de digestão ácida, do fígado, cérebro e carcaça, com presença destas na carcaça de todos os grupos. No cérebro, não houve relação diretamente proporcional à carga parasitária. A maior porcentagem de recuperação foi observada no grupo II tanto neste órgão como no total de larvas em outros tecidos. Após a análise dos resultados, sugere-se neste estudo que o Grupo I possivelmente apresenta uma infecção semelhante ao homem, em especial a Toxocaríase oculta (TO), com detecção de anticorpos IgG e migração larvária.
Palavras-chave: *Toxocara canis*; BALB/c; ELISA; IgG; recuperação larvária.
Órgão financiador: FAPESP

Infecção murina experimental por Toxocara canis: migração larvária e relação entre inóculo parasitário e resposta imunológica da classe IgG (V Congresso Internacional de Parasitologia Neotropical – COPANEO, 30 de maio a 3 de Junho de 2016).

ABSTRACT BOOK del V Congreso Internacional de Parasitología Neotropical (V COPANEO)
"Ecología parasitaria: Impacto en la Salud Global" 30 de mayo al 03 de junio del 2016, Lima, Perú.
The Biologist (Lima), 2016, vol. 14, jan-jun, Suplemento Especial 1

INFECÇÃO MURINA EXPERIMENTAL POR *TOXOCARA CANIS*: MIGRAÇÃO LARVÁRIA E
RELAÇÃO ENTRE INÓCULO PARASITÁRIO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA CLASSE IGG

INFECCIÓN MURINA EXPERIMENTAL POR *TOXOCARA CANIS*: MIGRACIÓN LARVARIA Y
RELACIÓN ENTRE INÓCULO PARASITARIO Y RESPUESTA IMUNOLÓGICA DE CLASE
IGG

TOXOCARA CANIS EXPERIMENTAL MURINE INFECTION: LARVAL MIGRATION AND
RELATIONSHIP BETWEEN PARASITIC INOCULUM AND IGG IMMUNE RESPONSE

Gabriela Rodrigues e Fonseca¹, Ronaldo César Borges Gryschek¹, Marcelo Andreetta Corral³, Sergio
Vieira dos Santos¹, Pedro Paulo Chieffi², Fabiana Martins de Paula³, Susana Angélica Zevallos
Lescano³

¹ Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo - LIM 06/IMTSP/USP

² Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo/FCMSCSP

³ Laboratório de Investigação Médica (LIM-06), Hospital das Clínicas - FMUSP, Brasil.
suzceles@hotmail.com

Estudou-se a dinâmica da resposta de anticorpos da classe IgG de camundongos experimentalmente infectados com *Toxocara canis* com diferentes inoculos de ovos, em diversos tempos de infecção, utilizando duas técnicas imunológicas. Camundongos BALB/c machos, de 6-8 semanas, foram oralmente infectados com 5 (GI), 50 (GII) e 500 (GIII) ovos larvados e sangrados pelo plexo orbital aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a infecção (dpi). Como controle negativo (C) utilizou-se um grupo constituído por 7 camundongos não infectados. Os soros foram processados por ELISA e *Western-blotting* para cada data e inoculo de ovos, utilizando antígeno de Excreção-Secreção obtido a partir da cultura de larvas de terceiro estágio de *T. canis* e ao final do experimento, foi realizada a recuperação das larvas no fígado, cérebro e carcaça. No presente trabalho não foram observadas larvas no fígado. No cérebro não houve relação diretamente proporcional à carga parasitária, com 6% de larvas recuperadas no GI, 3,33% no GI e 2,67% no GIII. Foram recuperadas larvas na carcaça de todos os grupos proporcional ao inoculo em números absolutos, entretanto quando comparado com o inoculo total o percentual do GI foi maior em relação aos outros dois grupos (8,33% no GI, 6,67% no GI e 4,37% no GIII). O ELISA e o *Western-blotting* foram positivos em todas as datas para a maioria das dosagens de ovos e, quanto maior a dosagem de ovos e mais próximo dos 60 dpi, mais intensa e elevada foi a resposta de IgG detectada com ambos os métodos diagnósticos. Nas condições experimentais observadas, o ELISA, quando comparado com a técnica de *Western blotting*, produziu melhores resultados em animais com baixa carga parasitária e na fase inicial da doença, com destaque para o 60º dpi; o *Western-blotting* mostrou-se mais sensível nos animais com alta carga parasitária e a partir dos 60 dpi, com bandas de aproximadamente 30kDa e 45 kDa presentes em todas as datas e inoculos utilizados.

Palavras-chave: BALB/c – Infecção experimental – ELISA – *Toxocara canis* – Western blotting
Órgão Financiador: FAPESP – Processo Nº 2014/07345-6.

Conventional PCR and its relation with immunological techniques in serum and organ samples in experimental murine model infected with *Toxocara canis* (XXV Congresso Brasileiro de Parasitologia, 03 a 06 de Setembro de 2017).

Conventional PCR and its relation with immunological techniques in serum and organ samples in experimental murine model infected with *Toxocara canis*.

Gabriela Rodrigues e Fonseca¹, Susana Angélica Zavallos Lescano², Fabiana Martins de Paula¹, Marcelo Andreetta Corral¹, Gessica Baptista de Melo², Priscilla Duarte Marques Fonseca², Sérgio Vieira dos Santos³, Pedro Paulo Chieffi³, Ronaldo Cesar Borges Gryschek¹.

¹ Laboratório de Investigação Médica 06 (LIM-06) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, Brasil

² Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – São Paulo/SP, Brasil

³ Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), São Paulo/SP, Brasil

Toxocariasis is still a neglected disease and the diagnostic techniques known so far present limitations, such as cross-reactions, especially in countries with high chances of polyparasitism, like Brazil. The use of molecular biology techniques presents promising results in the diagnosis of various parasites; however, there are few studies concerning the diagnosis of toxocariasis. In order to improve the understanding of Conventional Polymerase Chain Reaction and its relation with immunological diagnostic techniques, 42 BALB/c male mice, with 6-8 weeks old, were inoculated with five (Group I), 50 (Group II), or 500 *Toxocara canis* embryonated eggs (Group III) respectively and a Control Group was maintained uninfected. All of them were bled by the orbital plexus at 15, 30, 60 and 90 days post-infection and 24 mice were bled at 120 days post-infection for immunological diagnosis only. Serum samples were processed by ELISA and Western blotting for anti-*T. canis* IgG response, using excretory-secretory antigen obtained from *Toxocara canis* third-stage larvae. DNA samples obtained from serum, liver and brain were used for Conventional PCR along with two primers from *Toxocara* sp. ribosomal DNA. At the end of the experiment, larvae were recovered from liver, brain and carcass of three mice from each infected group. Larvae were recovered from brain and carcass in all groups, with highest larval recovery percentage observed in Group II. ELISA-IgG and Western blotting showed positive results at all post-infection days for most of inocula. The IgG response was more intense in animals infected with higher parasite load and closer to 60 days post-infection. In this study, ELISA was the most adequate test for IgG detection in serum in the initial phase of the disease and in animals of all groups, particularly those infected with lower parasite load; Western blotting showed better results in animals inoculated with a higher parasite load and in an advanced phase of the study. Conventional PCR was not able to amplify specific parasite DNA in serum samples in none of the Groups or days post-infection. On the other hand, parasite DNA was detected in some liver and brain samples. It's concluded, in this study, that serum is not the best sample for the diagnosis of experimental murine toxocariasis. Even though having limitations, the ELISA and Western blotting are still the most adequate tests for the diagnosis of experimental toxocariasis.

Keywords: *Toxocara canis*, PCR, Immunological techniques, murine model.

Financial Support: FAPESP 2014/07345-6

APÊNDICE E – Artigo publicado em periódico

Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017. 112(5): 382-386.

382 *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 112(5): 382-386, May 2017

Experimental toxocariasis in BALB/c mice: relationship between parasite inoculum and the IgG immune response

Gabriela Rodrigues e Fonseca^{1,4}, Sergio Vieira dos Santos^{1,2}, Pedro Paulo Chieffi², Fabiana Martins de Paula^{1,2}, Ronaldo Cesar Borges Gryschek^{1,3}, Susana Angélica Zavallos Lescano^{1,3,4}

¹Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

³Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica, São Paulo, SP, Brasil

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, São Paulo, SP, Brasil

BALB/c mice were inoculated with 5-500 *Toxocara canis* infective eggs, and bled at 15-120 days post infection (dpi) to evaluate the dynamics of IgG antibody response and larvae distribution. Positive results were observed in all occasions for every inoculum, and a direct proportional relationship between antibody detection and the parasitic load was observed. In samples collected at 60 dpi, detection of IgG was more intense, especially with the 50 and 500 egg doses; also, a correlation between antibody level and egg count was observed with these two inocula. At 120 dpi, a decrease in antibody titer was observed for all groups; and at the end of the experiment, larvae were recovered from carcass, liver and brain. In the liver, larvae were only found in mice inoculated with 500 *T. canis* eggs. In carcasses, these were recovered in all groups, and the group inoculated with 50 eggs showed the highest percentage of larvae in the brain.

Key words: *Toxocara canis* - BALB/c - ELISA - larval recovery

Toxocara canis and *T. cati*, common ascarid nematode in dogs and cats, are the primary etiological agents of toxocariasis. In man, infection can provoke syndromes like visceral larva migrans (VLM), ocular larva migrans (OLM), covert toxocariasis (CT), and neurotoxocariasis (NT) (Chieffi et al. 2009, Fillaux & Magnaval 2013, Macpherson 2013, Overgaauw & van Knapen 2013). All of whose diagnoses mainly depend upon serological techniques (Moreira et al. 2014).

Even though most humans infected with *Toxocara* larvae present an asymptomatic course, some patients can present with significant symptomatic disease. Smith and Noordin (2006) reviewed the principal symptoms and signs present in the three clinical syndromes of human toxocariasis. These include VLM: fever, pallor, malaise, hepatomegaly, respiratory and nervous disturbance, irritability, weight loss, cutaneous rash, myocarditis, hypergammaglobulinemia, leukocytosis and eosinophilia, elevated anti-A and anti-B isohemagglutinins; OLM: visual loss, strabismus, endophthalmitis, chorioretinitis, uveitis, retinal granuloma and detachment; and CT: abdominal pain, weakness, headache, coughing, sleep and behavioral disturbances. Neurological syndromes (NS) observed during infection of the central nervous system (CNS) with *Toxocara* are generally nonspecific, and frequently, eosinophilia is a nonexistent sign (Chieffi et al. 2009).

Toxocara spp. infect two types of host: the definitive, especially dogs (*T. canis*) and cats (*T. cati*), and paratenic hosts (rodents, mammals and even invertebrates) (Macpherson 2013). A paratenic host is one in which parasite development does not occur, but may serve to bridge an ecological, or trophic, gap in a parasite's life cycle (Bush et al. 2001). In paratenic hosts, *Toxocara* larvae penetrate the intestinal wall and, moving via the circulatory system, initiate the hepato-pulmonary phase, and advance to the myotropic-neurotropic phase, particularly accumulating in the brain and carcass (Abo-Shehadeh & Herbert 1984). They remain viable as encapsulated larvae for long time and, in this stage, they may continue their life cycle if the paratenic host is consumed as a prey by a definitive host (Strube et al. 2013).

Dubinsky et al. (1995) considered mammals as important sources for *Toxocara* spp. maintenance under natural conditions and, furthermore, as an environmental indicator of contamination by these helminths. Mice have been used as models for experimental toxocariasis studies because of their easy laboratory manipulation and the facility of tissue larval detection, as well as the ease of working with isogenic strains (Fan et al. 2015).

Studies in paratenic hosts, including mice, rats, rabbits, gerbils, and chickens, showed that *T. canis* larvae penetrate the small intestine walls when ingested and disseminate through the soft tissues of the body via systemic circulation. According to the literature, the most commonly affected organs are the liver, lung and eyes. The central nervous system, heart and skeletal muscles are affected less often (Camparoto et al. 2008).

Mice have frequently been used in studies investigating the migration and pathogenesis of this parasite. Strube et al. (2013) reported that haemorrhagic foci and parenchymatous congestion occurs in the lung and kid-

doi: 10.1590/0074-02760160341
Financial support: FAPESP (grant n° 2014/07345-6).
+ Corresponding author: suzales@hotmail.com
Received 27 July 2016
Accepted 27 December 2016