



Ministério Da Educação
Universidade Federal Do Rio Grande
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde



**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO NEMATÓDEO *Toxocara canis* SOBRE A
RESPOSTA DA VACINA CONTRA SARAMPO, CAXUMBA E RUBÉOLA EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Paula Teixeira Chaves

Rio Grande, RS

2023

Ministério Da Educação
Universidade Federal Do Rio Grande
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Da Saúde

**INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO NEMATÓDEO *Toxocara canis* SOBRE A
RESPOSTA DA VACINA CONTRA SARAMPO, CAXUMBA E RUBÉOLA EM
CAMUNDONGOS SWISS**

Paula Teixeira Chaves

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Farias da Costa de Avila

Rio Grande, RS
2023

Ficha Catalográfica

C512i Chaves, Paula Teixeira.

Influência da infecção pelo Nematódeo *Toxocara canis* sobre a resposta da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola em camundongos *Swiss* / Paula Teixeira Chaves. – 2023.
57 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Rio Grande/RS, 2023.

Orientadora: Dra. Luciana Farias da Costa de Avila.

1. Toxocaríase 2. Vacina 3. Camundongos 4. Imunomodulação
5. Resposta imune I. Avila, Luciana Farias da Costa de II. Título.

CDU 616.993

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Paula Teixeira Chaves

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

INFLUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO NEMATÓDEO *Toxocara canis* SOBRE A RESPOSTA DA VACINA CONTRA SARAMPO, CAXUMBA E RUBÉOLA EM CAMUNDONGOS SWISS

Banca Examinadora

Prof. Dr. Carlos James Scaini (FURG)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Membro externo) (UFPEL)

Profa. Dra. Talita Bandeira Roos (Membro externo) (UFPA)

Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora (Suplente) (FURG)

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila – FURG

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e por compreender minhas ausências. Em especial à minha filha Marina, que esteve ao meu lado em tantos momentos de estudo e produção e que me motiva a seguir em frente, e ao meu esposo Thiago, que me deu todo suporte que precisei para seguir em frente neste processo.

A minha orientadora Luciana, por seus ensinamentos, por toda dedicação ao meu trabalho e pela disponibilidade para me orientar e me ouvir nos momentos mais difíceis desta caminhada. Sem seu apoio não teria conseguido chegar até aqui.

Aos professores da banca, por aceitarem contribuir com este trabalho, compartilhando seus conhecimentos.

Aos docentes do PPG em Ciências da Saúde, por terem contribuído na minha formação, e aos colegas, pela parceria de sempre.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Parasitologia da Área Interdisciplinar em Ciências Biomédicas (AICB) da Faculdade de Medicina (FAMED) – FURG e à equipe do Biotério Setorial da FAMED por todo apoio e dedicação a este trabalho, me dando todo o suporte nos momentos em que precisei me ausentar para cuidar da minha mãe.

Aos meus colegas da UBSF São Miguel II por compreenderem minhas ausências na unidade e por muitas vezes assumirem tarefas que seriam minhas.

E por fim agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a concretização dessa etapa tão importante na minha vida pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Vacinação.....	11
2.2 Parasitoses <i>versus</i> Resposta imune.....	13
2.3 <i>Toxocara canis</i> : modelo de helminto a ser explorado como imunomodulador.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo geral.....	16
3.2. Objetivos específicos.....	16
4. METODOLOGIA.....	17
5. MANUSCRITO 1.....	18
6. CONCLUSÃO FINAL.....	34
7. BIBLIOGRAFIA.....	35
8. APÊNDICE 1.....	44
9. ANEXO 1	56

RESUMO

O calendário básico vacinal humano contempla a imunização contra o sarampo, caxumba e rubéola a partir dos 12 meses, doenças relevantes pelo seu histórico clínico e epidemiológico. Estudos revelam que os helmintos promovem modulação do sistema imune do hospedeiro, podendo interferir na resposta vacinal e causar prejuízo no estabelecimento da imunidade protetora. O nematódeo intestinal de cães *Toxocara canis* (*T. canis*) é o principal agente etiológico da toxocaríase humana, uma zoonose subdiagnosticada e negligenciada mundialmente. Em crianças, estudos de soroprevalência revelam níveis elevados de anticorpos para *T. canis*. Devido ao fato dos helmintos poderem causar prejuízo no estabelecimento de uma imunidade vacinal eficaz, torna-se relevante estudar a influência da infecção crônica por *T. canis* na resposta imunológica de vacinas do calendário básico da criança. O presente estudo avaliou se a infecção por *T. canis* interfere na resposta vacinal de camundongos inoculados com vacina para sarampo, caxumba e rubéola. Foram utilizados 18 camundongos da linhagem *Swiss*, divididos em três grupos: TxVac (infectados e vacinados), Vac (somente vacinados) e Cont (sem infecção e sem vacina). Para o estabelecimento da infecção crônica, o grupo TxVac foi previamente inoculado com ovos de *T. canis*. A vacina tríplice viral (Priorix®) foi administrada em duas doses nos camundongos dos grupos TxVac e Vac, sendo a primeira dose 60 dias após a inoculação dos ovos, e a segunda dose 30 dias após a primeira, ambas por via subcutânea, em volume de 50µl. Foram realizadas coletas de sangue nos dias 15, 30, 45 e 60 pós-vacinação (p.v) (1ª dose) para a avaliação do efeito da infecção por *T. canis* sobre a produção de anticorpos IgG oriundos da vacinação através do teste de ELISA. Ao final do experimento, no dia 60 p.v (1ª dose), foram coletados os esplenócitos de todos os grupos para avaliar a resposta imune celular, através da avaliação da transcrição gênica das citocinas *IFN γ* , *IL12*, *IL4*, *IL10* e *TGF β* . A infecção por *T. canis* foi confirmada com a recuperação de larvas no encéfalo, fígado e pulmões dos camundongos infectados por digestão tecidual. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a infecção por *T. canis* não alterou os níveis de anticorpos gerados pela vacinação. Entretanto, em relação às citocinas, a infecção por *T. canis* promoveu uma redução significativa de 12 vezes nos níveis de *IL12* e de 3,4 vezes os níveis de *IL10*. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de *IFN γ* e *TGF β* entre os grupos TxVac e Vac, embora os níveis de *TGF β* tenham sido 5,7 vezes mais elevados nos camundongos não infectados. A vacinação não teve efeito sobre os níveis de *IL4*, mas a infecção por *T. canis* resultou em uma redução de 30 vezes nos níveis dessa citocina. Conclui-se que, embora os níveis de anticorpos gerados pela vacina não tenham sofrido alteração nos camundongos com infecção crônica por *T. canis*, este nematódeo promoveu supressão de citocinas pró e anti inflamatórias nos animais vacinados.

Palavras-chave: toxocaríase, vacina, camundongos, imunomodulação, resposta imune.

ABSTRACT

The basic human immunization schedule includes immunization against measles, mumps and rubella from 12 months of age, relevant diseases due to their clinical and epidemiological history. Studies reveal that helminths promote modulation of the host's immune system, which may interfere with the vaccine response and cause damage to the establishment of protective immunity. The intestinal nematode of dogs *Toxocara canis* (*T. canis*) is the main etiologic agent of human toxocariasis, an underdiagnosed and neglected zoonosis worldwide. In children, seroprevalence studies reveal elevated levels of antibodies to *T. canis*. Due to the fact that helminths can impair the establishment of effective vaccine immunity, it becomes relevant to study the influence of *T. canis* infection on the immune response to vaccines in the child's basic schedule. The present study evaluated whether *T. canis* chronic infection interferes with the vaccine response of mice inoculated with measles, mumps and rubella vaccine. Eighteen Swiss mice were used, divided into three groups (TxVac, Vac and Cont). For the establishment of chronic infection, the TxVac group was previously inoculated with *T. canis* eggs. The triple viral vaccine (Priorix®) was administered in two doses to mice in the TxVac and Vac groups, the first dose 60 days after egg inoculation, and the second dose 30 days after the first, both subcutaneously, in volume of 50µl. Blood collections were performed on days 15, 30, 45 and 60 post-vaccination (p.v)(1st dose) to assess the effect of *T. canis* infection on the production of IgG antibodies resulting from vaccination through the ELISA test. At the end of the experiment, on day 60 p.v. (1st dose), splenocytes were collected from all groups to evaluate the cellular immune response, through the evaluation of the gene transcription of the cytokines *IFN*γ, *IL12*, *IL4*, *IL10* and *TGF*β. *T. canis* infection was confirmed with the recovery of larvae in the brain, liver and lungs of infected mice. From the results obtained, it was possible to observe that the infection by *T. canis* did not alter the levels of antibodies generated by the vaccination. However, regarding cytokines, *T. canis* infection promoted a significant reduction of 12 times in *IL12* levels and 3.4 times in *IL10* levels. No significant differences were found in *IFN*γ and *TGF*β levels between the TxVac and Vac groups, although *TGF*β levels were 5.7 times higher in uninfected mice. Vaccination had no effect on *IL4* levels, but *T. canis* infection resulted in a 30-fold reduction in *IL4* levels. It is concluded that, although the levels of antibodies generated by the vaccine have not changed in mice with chronic infection by *T. canis*, this nematode promoted suppression of pro and anti-inflammatory cytokines in vaccinated animals.

Keywords: toxocariasis, vaccine, mice, immunomodulation, immune response.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Níveis de anticorpos IgG gerados pela vacina contra o sarampo, caxumba e rubéola analisados nos dias 15, 30, 45 e 60 pós vacinação nos grupos TxVac (infecção crônica por *T. canis* e vacina tríplice viral), Vac (somente administração de vacina tríplice viral) e controle (sem infecção e sem vacina). A vacina foi aplicada em duas doses na primeira (dia zero) e segunda dose da vacina (dia 30). Diferentes letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).....23
- Figura 2: Média da transcrição gênica avaliadas por qPCR das citocinas *IL12*, *IFN γ* , *IL10*, *IL4* e *TGF β* nos grupos vacinados, infectados ou não, em relação ao controle. TxVac: infecção por *Toxocara canis* e vacina tríplice viral; Vac: Somente administração de vacina tríplice viral; Cont: sem infecção e sem vacinação. Asteriscos (*) significam diferença estatística pelo teste T de Student's ($P < 0,05$).....24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de correlação entre os valores de transcrição gênica das citocinas <i>IL12</i> , <i>IFNγ</i> , <i>IL10</i> , <i>IL4</i> e <i>TGFβ</i> e o número de larvas de <i>Toxocara canis</i> recuperadas nos camundongos.....	25
---	----

1. INTRODUÇÃO

A vacinação é uma das principais conquistas em saúde pública, sendo uma maneira eficaz para a redução de doenças imunopreveníveis, além de reduzir as taxas de mortalidade infantil e prevenir incapacidades ao longo da vida (WHO, 2015; 2016). As vacinas agem como indutores de anticorpos, adquiridos a partir do contato com os antígenos presentes nesses produtos, sendo capazes de desencadear uma resposta imune sem causar doença, conferindo aquisição de células de memória (REIS *et al.*, 2009).

Um problema registrado com recorrência é o prejuízo na proteção quando a vacinação ocorre durante o curso de uma infecção parasitária por helmintos. Exemplos documentados desse fato incluem esta relação com a vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) (ELIAS *et al.*, 2008), vacina de DNA de *Plasmodium falciparum* (NOLAND *et al.*, 2010), vacina do tétano (NOOKALA *et al.*, 2004), vacina da difteria (HASEEB e CRAIG, 1997), e com uma candidata a vacina contra HIV-1 (DA'DARA *et al.*, 2006). Tal diminuição da eficácia vacinal está relacionada à modulação do sistema imune realizada pelos helmintos, uma vez que estes suprimem células T helper tipo 1 (Th1) e estimulam células T helper tipo 2 (Th2). Este fato é de suma importância, principalmente em enfermidades virais as quais, geralmente, necessitam de resposta imune celular Th1 (FLORES, 2007). Outro exemplo pode ser observado em um estudo que avaliou a eficácia de uma vacina contra malária, na qual camundongos livres do nematódeo gastrointestinal *Heligmosomoides polygyrus* obtiveram uma resposta imune protetora significativamente superior àqueles que estavam parasitados. Segundo os autores, a supressão de células Th1, promovida por helmintos, foi a causa da redução do efeito protetor da vacina (SU *et al.*, 2006).

O modelo de helminto proposto a ser avaliado neste estudo é o nematódeo *Toxocara canis*, principal agente etiológico da toxocaríase, que é uma zoonose cosmopolita. Apesar da elevada prevalência em países em desenvolvimento (HOTEZ e WILKINS, 2009) e também presente em países desenvolvidos (WOODHALL *et al.*, 2014), é uma doença subdiagnosticada. Em países da América do Norte é considerada uma das helmintíases mais prevalentes (HOTEZ e WILKINS, 2009).

Embora vários estudos com helmintos tenham documentado a ocorrência de interferências no desenvolvimento da resposta imune vacinal, alguns resultados são contraditórios. Os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune induzida por helmintos ainda são pouco claros. No entanto, o modelo murino tem se mostrado útil para o esclarecimento destes processos. Em um estudo que avaliou a influência da infecção por *T.*

canis na resposta imune vacinal contra Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV5) em camundongos foi possível observar que no grupo infectado por *T. canis* houve diminuição de *IFN-γ*, sugerindo que a modulação promovida por *T. canis* altera a resposta imune celular contra BoHV5 (AVILA *et al.*, 2011).

Um estudo realizado no Reino Unido avaliou as respostas de citocinas à subunidade B da toxina da cólera (CT-B) em indivíduos infectados por *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) e que receberam a vacina com vírus vivos CVD 103-HgR. Como conclusão, os autores verificaram que a infecção por *A. lumbricoides* diminui a eficácia da vacinação com CVD 103-HgR que é baseada na produção de *IL2* e *IFNγ*. Além disso, o tratamento com albendazol antes da vacinação foi capaz de reverter parcialmente o déficit na *IL2* (COOPER *et al.*, 2001). Autores que analisaram a interferência na vacinação induzida pelo nematódeo *Litomosoides sigmodontis* observaram que a infecção crônica reduziu o número de células B específicas do antígeno, bem como, os títulos de IgG. As respostas IgG1 associadas a Th2 e IgG2 associadas a Th1 foram suprimidas. Os resultados sugerem que as infecções por helmintos podem promover alteração na resposta imune vacinal (HABEN *et al.*, 2014).

Em virtude da possibilidade de alteração na resposta vacinal durante infecções por helmintos, e pelo fato de estudos soropidemiológicos mostrarem que a população infantil apresenta taxas importantes de exposição ao nematódeo *Toxocara canis*, torna-se relevante estudar a influência desta infecção na resposta imune desenvolvida por vacinas do calendário básico da criança. Como a modulação do sistema imune promovida pela infecção crônica por *Toxocara canis* pode prejudicar a resposta protetora promovida pela vacina contra sarampo, caxumba e rubéola, este estudo avaliou se a infecção por este parasito interfere na resposta vacinal de camundongos inoculados com a vacina contra sarampo, caxumba e rubéola.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vacinação

O Programa Nacional de Imunizações (PNI) organiza toda a política nacional de vacinação da população brasileira e tem como missão o controle, a eliminação e a erradicação de doenças imunopreveníveis. É considerado uma das principais e mais relevantes intervenções em saúde pública no Brasil, em especial pelo importante impacto obtido na redução da morbimortalidade causada pelas doenças imunopreveníveis (BRASIL, 2014).

Atualmente, o calendário de imunizações de rotina para crianças a partir de 12 meses de idade inclui as vacinas contra sarampo, caxumba e rubéola. A rotina de vacinação prevista no calendário vacinal é a seguinte: aos 12 meses deve-se administrar a vacina tríplice viral e aos 15 meses a vacina tetraviral (Sarampo, Caxumba, Rubéola e Varicela) em crianças já vacinadas com a primeira dose de tríplice viral (BRASIL, 2022). Crianças, adolescentes e adultos que não receberam essas doses na infância e que não tiveram as doenças prevenidas pela vacina, devem ser vacinados a qualquer momento: duas doses com intervalo mínimo de 30 dias entre elas (BALLALAI *et al.*, 2018).

Após os últimos casos de sarampo em 2015, o Brasil recebeu em 2016 a certificação da eliminação do vírus. Nos anos de 2016 e 2017, não foram confirmados casos de sarampo no País. Em 2018 foram confirmados 9325 casos da doença. No ano de 2019, após um ano de circulação do vírus do mesmo genótipo, o País perdeu a certificação de “País livre do vírus do sarampo”, dando início a novos surtos, com a confirmação de 20901 casos da doença. Em 2020 foram confirmados 8448 casos e, em 2021, 676 casos de sarampo foram confirmados (BRASIL, 2022).

Surtos de caxumba entre escolares com altas coberturas vacinais têm sido descritos na literatura internacional. Segundo o *Center of Disease Control* (CDC), desde a era pré-vacinal, houve uma diminuição de mais de 99% nos casos de caxumba nos Estados Unidos, entretanto, nos últimos anos, surtos ocorreram em ambientes onde há contato próximo como escolas e faculdades, com tamanho, duração e propagação limitada. Na Europa, Bélgica, República Tcheca, Inglaterra e País de Gales houve relatos de surtos de caxumba predominantemente em escolares adolescentes em 2011 e Sérvia (2012), Holanda (2013) e França (2013) em adultos jovens (CDC, 2021).

No Rio Grande do Sul, a notificação de surtos de caxumba no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foi implementada em 2016, por isso não há série histórica. No entanto, desde 2015 há notificação de surtos da doença, nos municípios de Porto Alegre, Canoas, Canela e Jaguarão. Em 2016, foram notificados 449 surtos envolvendo 2473 indivíduos. A Coordenadoria Regional de Saúde (CRS) que apresenta maior número de surtos registrados é a 3ª CRS (234 surtos), seguida da 2ª CRS (105 surtos). Os municípios de Rio Grande (208 surtos) e Porto Alegre (82 surtos) apresentaram a maior ocorrência de surtos (dados preliminares) (CEVS, 2023).

A rubéola e a síndrome da rubéola congênita estão oficialmente eliminadas no Brasil e nos demais países das Américas desde 2015. O último caso confirmado de rubéola em um brasileiro foi registrado em 2008 e de Síndrome da Rubéola Congênita, em 2009. Desde então,

o país registrou apenas um caso de rubéola importado, que é quando o doente é um viajante, e foi identificado no Brasil, em 2014 (BRASIL, 2019).

2.2 Parasitoses versus Resposta imune

As infecções por helmintos são caracteristicamente crônicas, sendo que algumas espécies parasitam o hospedeiro por anos e até mesmo décadas (HELMBY, 2009). Já se sabe que as infecções parasitárias estão associadas à tolerância imunológica (MALHOTRA *et al.*, 2009; JOHNSTON *et al.*, 2013; 2016) a qual permite a sobrevivência do parasito e minimiza os danos no hospedeiro (MPAIRWE *et al.*, 2014). A sobrevivência dos helmintos no hospedeiro por longos períodos de tempo é o resultado de um processo de adaptação entre o hospedeiro e o parasito. No entanto, a infecção por helmintos causa danos aos tecidos do hospedeiro, produzindo a liberação de sinais que induzem o recrutamento de várias células, incluindo células imunes inatas, como macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos e mastócitos (MOTRAN *et al.*, 2018).

Os helmintos são parasitos capazes de modular o sistema imune do hospedeiro a partir da liberação de um espectro de moléculas imunomoduladoras. (MAIZELS *et al.*, 2018). Durante o período crônico da infecção, é comum o aumento de células T reguladoras (Treg), as quais produzem as citocinas regulatórias *IL10* e *TGFβ* gerando, portanto, mais diferenciação deste tipo celular (VAN RIET *et al.*, 2007; COUPER *et al.*, 2008, DE ARAÚJO *et al.*, 2011). Essa modulação limita a proliferação de células imunes efetoras como T CD4⁺, T CD8⁺ e células Natural Killer (NK), prejudicando o desenvolvimento de uma memória imunológica (MACGILLIVRAY e KOLLMANN, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014). Isto significa que infecções parasitárias podem alterar a resposta imune e, por essa razão, pode haver maior suscetibilidade à infecção por determinados patógenos e prejuízo na imunidade adquirida, a qual é necessária para uma resposta vacinal eficiente (RODRIGUES *et al.*, 2014). Independente do mecanismo envolvido, sugere-se que a interação entre uma infecção parasitária e uma resposta vacinal tende a afetar negativamente a imunização (WAIT *et al.*, 2020).

Até o momento, as pesquisas realizadas para avaliar a resposta vacinal em pacientes com infecções parasitárias apresentam resultados heterogêneos. Em um dos estudos, foi avaliado em modelo murino o impacto da infecção pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) sobre a eficácia de uma possível vacina para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Através da avaliação dos anticorpos, os autores observaram que animais infectados por *S. mansoni* tiveram prejuízo na resposta à vacina contra o HIV em comparação com animais não infectados (DZHIVHUHO *et al.*, 2018). Além disso, neste mesmo estudo foi observado

que a vacina administrada em indivíduos parasitados poderia, inclusive, resultar em agravamento desta infecção. Em outro estudo, foi observado que a infecção por *S. mansoni* reduz a produção de anticorpos gerados por vacina contra o sarampo em crianças pré-escolares, e que o tratamento com praziquantel promoveria melhora da resposta vacinal (TWEYONGYERE *et al.*, 2019).

Pesquisadores avaliaram o impacto das infecções por helmintos na eficácia da vacinação contra influenza em camundongos infectados pelo nematóide filarial *Litomosoides sigmodontis*. Foi observado que a infecção pelo helminto reduziu a resposta de anticorpos à vacinação contra a gripe sazonal. Respostas prejudicadas também são observadas quando as vacinas são realizadas após a eliminação de uma infecção helmíntica prévia, sugerindo que os indivíduos em áreas endêmicas de helmintos nem sempre podem beneficiar da vacinação, mesmo sem estarem acometidos por uma helmintose no momento da vacinação (HARTMANN *et al.*, 2019). Segundo os autores, as infecções helmínticas induzem a expansão de células T reguladoras CD4 + CD49 + LAG-3 + tipo 1 produtoras de *IL 10*, que podem prejudicar a resposta vacinal (HARTMANN *et al.*, 2019).

Em uma pesquisa, os autores avaliaram se a resposta imunológica da vacina pneumocócica variou entre três grupos de crianças: 1. Expostas a infecções parasitárias no útero materno; 2. Previamente infectadas na infância e 3. Infectadas no momento da imunização. As crianças foram rastreadas para malária, esquistossomose, filariose, helmintos e protozoários intestinais. Os participantes receberam vacina pneumocócica decavalente e, quatro semanas depois, a sorologia foi repetida para avaliar a resposta da vacina. Foi observado que possivelmente a hiporresponsividade à vacina conjugada pneumocócica estaria associada ao crescimento retardado das crianças causado pela infecção parasitária, e não somente pela presença desses parasitos (NAYAKWADI SINGER *et al.*, 2017).

Autores de um estudo desenvolvido no Gabão, avaliaram o impacto na resposta vacinal em bebês cujas mães estavam infectadas por helmintos durante a gestação. Apesar da infecção materna promover uma proteção imunológica fetal contra o parasito, os autores observaram que não houve interferência na resposta imune dos bebês em vacinas de rotina do calendário, como sarampo, hepatite B e difteria. Foi observada apenas uma redução não significativa nos níveis de anticorpos produzidos por estas crianças quando comparadas com aquelas cujas mães não estavam infectadas na gravidez (FLÜGGE *et al.*, 2020).

2.3 *Toxocara canis*: modelo de helminto a ser explorado como imunomodulador

A toxocaríase humana é causada principalmente por larvas de *Toxocara canis* ou *Toxocara cati*, que são nematóides ascarídeos intestinais de canídeos e felinos, respectivamente (MAGNAVAL *et al.*, 2001). A via de transmissão é fecal-oral, e a infecção humana ocorre após a ingestão de ovos do parasito em vegetais crus contaminados (ROSTAMI *et al.*, 2016) de solo contaminado (em jardins, caixas de areia e playgrounds) (FAKHRI *et al.*, 2018) e de larvas em carnes mal cozidas ou cruas de hospedeiros paratênicos (OVERGAAUW *et al.*, 2013). É possível que também ocorra a transmissão através do contato direto com animais de estimação (MERIGUETI *et al.*, 2017; HOLLAND, 2017).

Os principais hospedeiros definitivos de *T. canis* são os cães jovens, os quais apresentam as formas adultas no seu intestino e liberam os ovos do parasito em suas fezes. Locais como parques infantis e caixas de areia são frequentemente acessados por cães e apresentam alta probabilidade de contaminação (KROTEN *et al.*, 2016). Crianças são mais vulneráveis à infecção pelo parasito devido ao contato direto com o solo contaminado em momentos de recreação (COLLI *et al.*, 2010; MAZUR-MELEWSKA *et al.*, 2012), além do fato de não apresentarem compreensão adequada quanto aos cuidados com a lavagem das mãos.

A Toxocaríase está associada a várias síndromes clínicas, incluindo larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO) e pode ocasionar doenças neurológicas, psiquiátricas, cardíacas, alergias na pele e/ou asma (MOHAMMADZADEH *et al.*, 2018; AGHAEI *et al.*, 2018; FAN *et al.*, 2015; LUNA *et al.*, 2018; ALVARADO-ESQUIVEL, 2013; KUENZLI *et al.*, 2016). Também está associada a morbidades importantes que preocupam a saúde pública, tendo sido incluída na lista de zoonoses negligenciadas (LEE *et al.*, 2014; PARISE *et al.*, 2014). Pela magnitude de sua prevalência, a toxocaríase é uma doença relevante que deve receber a atenção do sistema público de saúde (FIALHO *et al.*, 2016).

Os sintomas mais comuns da toxocaríase são febre, dor abdominal, hepatomegalia, esplenomegalia, eosinofilia, pneumonia, dentre outros (FIALHO *et al.*, 2016 e 2020). As larvas de *Toxocara sp.* não completam seu ciclo de vida em humanos que, assim como outros hospedeiros, são considerados hospedeiros paratênicos, ou seja, não eliminam os ovos do parasito nas fezes. Estudos de soroprevalência em crianças com idade escolar revelam níveis que podem ultrapassar os 50% em alguns países (SCHOENARDIE *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2014; GYANG *et al.*, 2015).

Os mecanismos pelos quais a infecção por *T. canis* modula a resposta imune ainda são pouco compreendidos, especialmente o perfil de citocinas produzidas, visto que estas variam conforme o tecido parasitado e o tempo de infecção (PINELLI *et al.*, 2007; HAMILTON *et al.*,

2008). Sendo assim, a falta de conhecimento dos componentes da resposta imune que intervêm na proteção contra este parasito torna-se um impedimento para o desenvolvimento de medidas de controle.

Como já verificado em outras helmintoses, a participação de células Th1, com liberação das citocinas *IL12* e *IFN γ* , é importante para a destruição das larvas (KURODA *et al.*, 2001). Entretanto, o parasito promove uma imunomodulação, com supressão dessas citocinas Th1 a fim de escapar da resposta imune e permanecer mais tempo no hospedeiro. Durante a fase crônica, ocorre um predomínio de células Th2, com liberação de *IL4*, *IL5* e *IL13* (PINELLI *et al.*, 2007). Esta supressão de células Th1 foi também confirmada através da estimulação *in vitro* de esplenócitos por larvas de *T. canis*, em que houve aumento na expressão de *IL4* e *IL10* (MANZANO *et al.*, 2019).

Autores avaliaram a resposta imune de bovinos infectados por *T. canis*, imunizados com a vacina contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). O experimento também foi realizado em camundongos BALB/c para avaliação da resposta imune celular a partir da transcrição gênica de citocinas presentes em esplenócitos desses animais. Os dados obtidos no estudo sugerem que a infecção por *T. canis* é capaz de modular a resposta imune à vacina em bovinos (MENEGON *et al.*, 2020). Das novilhas positivas para *T. canis*, 40% apresentaram título de BoHV-5 SN \leq 1.32, enquanto novilhas negativas para *T. canis* (60%) tinham título de BoHV-5 SN \geq 1:128. Camundongos infectados por *T. canis* apresentaram título de BoHV-5 SN \leq 1:2, enquanto camundongos não infectados com *T. canis* título de BoHV-5 SN \geq 1:8. Os esplenócitos de camundongos do grupo controle estimulados com BoHV-5 tiveram uma transcrição de mRNA significativa ($p < 0.05$) para as citocinas *IL12*, *IL17* e *IL23*, enquanto as mesmas citocinas foram reguladas negativamente em camundongos infectados com *T. canis*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar se a infecção crônica por *Toxocara canis* interfere na resposta vacinal de camundongos inoculados com a vacina contra sarampo, caxumba e rubéola.

3.2. Objetivos específicos

a) Avaliar a influência da infecção por *T. canis* sobre a cinética da produção de anticorpos IgG desenvolvidos em modelo experimental vacinado contra sarampo, caxumba e rubéola.

b) Avaliar a influência da infecção por *T. canis* sobre a resposta imune celular (transcrição gênica das citocinas *IFN* γ , *IL12*, *IL4*, *IL10* e *TGF* β) em modelo experimental vacinado contra sarampo, caxumba e rubéola.

4. METODOLOGIA

As descrições detalhadas dos métodos utilizados neste estudo estão descritas no manuscrito: **“Infecção crônica por *Toxocara canis* modula citocinas, mas não altera os títulos de anticorpos IgG total promovidos por vacina contra sarampo, caxumba e rubéola em camundongo *Swiss*”**.

5. MANUSCRITO 1

Infecção crônica por *Toxocara canis* modula citocinas, mas não altera os títulos de anticorpos IgG total promovidos por vacina contra sarampo, caxumba e rubéola em camundongo *Swiss*

O manuscrito será submetido na revista Journal of Helminthology.

Infecção crônica por *Toxocara canis* modula citocinas, mas não altera os títulos de anticorpos IgG total promovidos por vacina contra sarampo, caxumba e rubéola em camundongo *Swiss*

***Toxocara canis* chronic infection modulates cytokines but does not alter the total IgG antibody titers promoted by the vaccine against measles, mumps and rubella in *Swiss* mice**

RESUMO

A vacina contra sarampo, caxumba e rubéola faz parte do calendário vacinal de crianças a partir dos 12 meses de idade. Os helmintos podem modular o sistema imunológico do hospedeiro, interferindo na resposta vacinal e imunidade protetora. O nematódeo *Toxocara canis* é o principal agente causador da toxocaríase humana, uma zoonose subdiagnosticada. Considerando o impacto dos helmintos na eficácia da imunidade vacinal, avaliamos neste estudo se a infecção por *T. canis* interfere na eficácia da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola. Camundongos *Swiss* foram divididos em três grupos: TxVac, Vac e Cont, este último recebeu somente solução salina. No início do experimento, o grupo TxVac foi infectado por *T. canis*. A vacina tríplice viral foi administrada em duas doses nos grupos TxVac e Vac. Foram coletadas amostras de sangue pós-vacinação para avaliar a produção de anticorpos IgG. No dia 60 p.v. (pós-vacinação) (1ª dose), foram coletados os esplenócitos de todos os grupos para avaliar a resposta imune celular, através da avaliação da transcrição gênica das citocinas *IFN γ* , *IL12*, *IL4*, *IL10* e *TGF β* . O helminto não alterou os níveis de anticorpos gerados pela vacinação, porém reduziu os níveis de *IL12* e *IL10*. Em conclusão, embora os níveis de anticorpos gerados pela vacina não tenham sido afetados pela infecção crônica por *T. canis*, o nematódeo suprimiu a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias nos animais vacinados.

Palavras-chave: toxocaríase, vacina, camundongos, imunomodulação, resposta imune.

Introdução

A vacinação é uma conquista significativa na saúde pública e representa uma forma eficaz de reduzir doenças imunopreveníveis, bem como diminuir a mortalidade infantil e evitar incapacidades ao longo da vida (WHO, 2015; 2016). As vacinas funcionam estimulando a produção de anticorpos gerados após a exposição aos antígenos presentes nesses produtos, sem desenvolver a doença no indivíduo, e proporcionando a produção de células de memória imunológica (Reis *et al.*, 2009). No Brasil, o calendário de vacinação de rotina para crianças inclui uma dose da vacina tríplice viral contra sarampo, caxumba e rubéola aos 12 meses de idade e uma dose de tetraviral que protege contra sarampo, caxumba, rubéola e varicela aos 15 meses (Brasil, 2022). Aqueles que não receberam essas vacinas na infância e não tiveram as respectivas doenças, realizam a vacinação em qualquer momento, com duas doses com um intervalo mínimo de 30 dias entre elas (Ballalai *et al.*, 2018).

A eficácia das vacinas pode ser afetada quando a sua administração ocorrer durante o curso de uma infecção parasitária por helmintos (Rodrigues *et al.*, 2014; Macgillivray e Kollmann, 2014; Wait *et al.*, 2020). Isto pode estar relacionado ao fato de que os parasitos são capazes de modular o sistema imune do hospedeiro (Maizels *et al.*, 2018) podendo alterar a resposta vacinal. Por essa razão, poderá haver uma maior suscetibilidade à infecção por determinados patógenos e prejuízo na imunidade adquirida, a qual é necessária para uma resposta vacinal eficiente (Rodrigues *et al.*, 2014).

As infecções causadas por helmintos são caracteristicamente crônicas, com algumas espécies parasitando o hospedeiro por períodos que podem se estender por anos, e até mesmo décadas (Helmbly, 2009). Estudos apontam que as infecções parasitárias estão associadas a um fenômeno chamado tolerância imunológica (Malhotra *et al.*, 2009; Johnston *et al.*, 2013; 2016), que permite a sobrevivência do parasito ao minimizar os danos ao hospedeiro (Mpairwe *et al.*, 2014).

O nematódeo *Toxocara canis*, agente etiológico da toxocaríase, foi o modelo de helminto avaliado neste estudo. Esta zoonose apresenta alta prevalência em países em desenvolvimento (Hotez e Wilkins, 2009) e também está presente em países desenvolvidos (Woodhall *et al.*, 2014), porém apresenta considerável subnotificação. Em países da América do Norte é considerada uma das helmintoses mais prevalentes (Hotez e Wilkins, 2009). Os principais hospedeiros definitivos de *T. canis* são os cães jovens, os quais apresentam as formas adultas no seu intestino e liberam os ovos do parasito através de suas fezes. A via de infecção humana é fecal-oral e ocorre após a ingestão de ovos ou larvas de *T. canis* (Fakhri *et al.*, 2018;

Rostami *et al.*, 2016; Overgaauw *et al.*, 2018). A contaminação do solo de parques e caixas de areia se deve ao acesso frequente de cães (Krotten *et al.*, 2016), fazendo com que crianças tornem-se mais vulneráveis à infecção pelo parasito devido ao contato nos momentos de recreação (Colli *et al.*, 2010; Mazur-Melewska *et al.*, 2012).

O modelo murino tem sido utilizado em estudos que visam compreender os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune induzida por helmintos (Su *et al.*, 2006; Avila *et al.*, 2011; Hartmann *et al.*, 2019; Menegon *et al.*, 2020). Um estudo analisou como a infecção por *T. canis* afeta a resposta imune vacinal contra o Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV5) em camundongos. Foi observado que no grupo infectado por *T. canis* houve uma redução do $IFN\gamma$, indicando que a modulação causada por *T. canis* afeta a resposta imune celular contra o BoHV5 (Avila *et al.*, 2011).

Apesar de algumas pesquisas demonstrarem alterações na resposta imune vacinal na presença de alguma helmintose, existem resultados contrários a esta ocorrência. Devido à elevada exposição parasitária registrada em crianças e à possibilidade de alteração na resposta vacinal causada pelos helmintos, torna-se relevante investigar a possível influência da infecção por *T. canis* na resposta imune de vacinas do calendário básico infantil. O presente estudo avaliou se a infecção por *T. canis* interfere na resposta vacinal de camundongos inoculados com vacina para sarampo, caxumba e rubéola.

Material e Métodos

Fêmeas do parasito foram obtidas a partir do tratamento de cães jovens com o anti-helmíntico palmoato de pirantel (15 mg/kg). A seguir, foi realizada a histerectomia destas fêmeas e obtidos os ovos não embrionados, que foram incubados por 30 dias a 28°C, umidade maior que 80% e com aerações diárias (Avila *et al.*, 2011).

Foram utilizados camundongos *Swiss*, fêmeas, com idade entre 4 e 6 semanas, divididos em três grupos. Os camundongos foram mantidos no biotério em racks ventilados com minisoladores (Tecniplast), na temperatura ambiente de 21°C, umidade relativa do ar de 45 a 65% e luminosidade 12 claro / 12 escuro, recebendo água e ração *ad libitum*. A densidade máxima de cada caixa foi de cinco camundongos. Os grupos foram divididos da seguinte forma: TxVac: Infecção crônica por *T. canis* e vacina tríplice viral (10 camundongos); Vac: somente administração de vacina tríplice viral (5 camundongos); Cont: sem infecção e sem vacinação (5 camundongos). Para o desenvolvimento da infecção crônica, o grupo TxVac foi inoculado previamente com 100 ovos embrionados de *T. canis* em solução fisiológica 0,9% (volume de 0,2mL), pela via intragástrica (IG), utilizando uma sonda de gavagem. Estes foram mantidos

por 60 dias, a contar da data da inoculação dos ovos, em condições de biotério (Avila *et al.*, 2011).

Após esse período, os camundongos dos grupos TxVac e Vac foram inoculados com a primeira dose da vacina tríplice viral, disponível na rede pública para a prevenção do sarampo, caxumba e rubéola. (Priorix® sarampo, caxumba, rubéola - GSK), recebendo a segunda dose 30 dias após. Cada camundongo recebeu 50µl da vacina reconstituída (Shaw *et al.*, 2008). Cada 500 uL de vacina reconstituída possui não menos do que $10^{3,0}$ CCID₅₀ do vírus do sarampo de cepa Schwarz; não menos do que $10^{3,7}$ CCID₅₀ do vírus da caxumba de cepa RIT 4385 e não menos do que $10^{3,0}$ CCID₅₀ do vírus da rubéola de cepa Wistar RA 27/3, conforme informações do fabricante da vacina. No mesmo período, o grupo Cont recebeu solução fisiológica 0,9% estéril, em duas doses pela mesma via subcutânea. Foram realizadas coletas de sangue por meio de punção da veia submandibular de todos os camundongos nos dias 15, 30, 45 e 60 p.v (1ª dose) para a obtenção de soro. Para avaliar os níveis de anticorpos gerados a partir da vacina aplicada, os soros dos camundongos foram testados a partir de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) utilizando a própria vacina como antígeno para adsorver a placa. A técnica de ELISA foi realizada *in house* conforme protocolos já estabelecidos (Santos *et al.*, 2018).

No dia 60 p.v (1ª dose), os camundongos dos três grupos foram submetidos à eutanásia e tiveram os órgãos coletados para a confirmação da infecção por *T. canis*. Foi aplicada a técnica de digestão tecidual para a recuperação e quantificação das larvas de *T. canis* no encéfalo, fígado e pulmões. O exame foi realizado em microscópio óptico, em aumento de 100x (Wang e Luo, 1998). Foram coletados os esplenócitos, obtidos por maceração dos baços, sendo o material centrifugado e lavado com solução balanceada de Hank's e, posteriormente, submetido à solução de lise. Após, as células foram lavadas novamente e armazenadas em TRIreagent (Sigma-Aldrich®) a -80°C. Posteriormente foi realizada a extração de RNA total e a síntese de cDNA segundo instruções do fabricante High Capacity Applied Biosystems™. Para avaliar o efeito da infecção por *T. canis* sobre a imunidade celular dos animais vacinados, foi utilizada a amplificação de fragmentos de genes das citocinas *IL12*, *IFNγ*, *IL10*, *IL4* e *TGFβ* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa – qPCR. Os *primers* específicos para β-actina foram utilizados como normalizadores. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata (Avila *et al.*, 2016). O experimento foi aprovado junto à Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA - FURG) sob o parecer P011/2020.

Foi realizado Teste T de Student's para comparação das médias dos grupos, considerando $p < 0,05$ para significância estatística. Foi avaliado o coeficiente de correlação (CORREL) entre cada uma das citocinas e o número de larvas nos camundongos vacinados.

Resultados

Na figura 1 podem ser observadas as absorvâncias obtidas a partir do teste de ELISA para a detecção de anticorpos vacinais nos soros coletados nos diferentes tempos pós-vacinação. A inoculação de duas doses da vacina Priorix® gerou produção de anticorpos nos grupos TxVac e Vac. Entretanto, após a segunda dose da vacina, foi possível observar diferença significativa nos níveis de anticorpos. Assim, no dia 60, quando comparados ao controle não vacinado, os grupos TxVac e Vac apresentaram uma elevação nos níveis de anticorpos de 6,3 e 5,6 vezes, respectivamente. Ao compararmos os grupos TxVac e Vac podemos observar que a infecção por *T. canis* não alterou a produção de anticorpos vacinais em nenhum dos dias analisados.

A infecção experimental foi confirmada nos animais do grupo TxVac, tendo sido recuperadas, em média, 9 larvas/camundongo. Dois camundongos deste grupo não desenvolveram a infecção, ou seja, não tiveram larvas recuperadas nos órgãos analisados, sendo, portanto, excluídos do experimento.

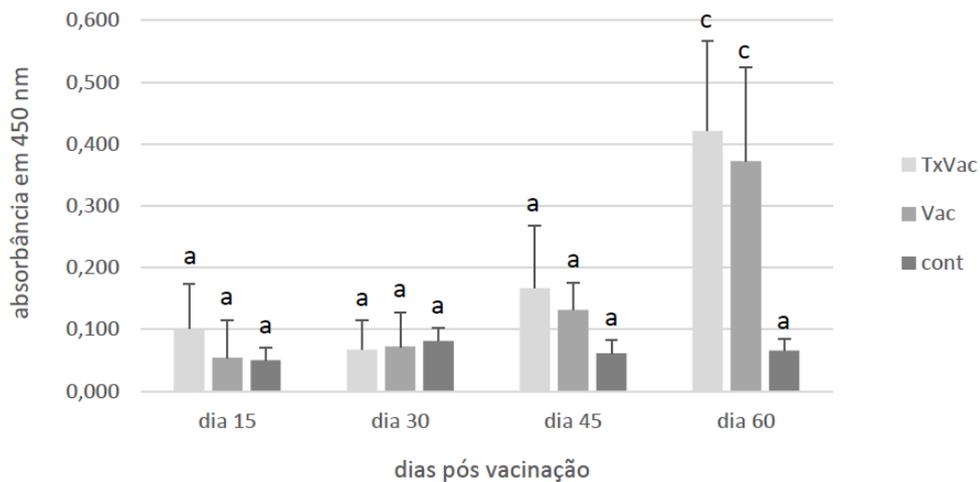


Figura 1: Níveis de anticorpos IgG gerados pela vacina contra o sarampo, caxumba e rubéola analisados nos dias 15, 30, 45 e 60 pós vacinação nos grupos TxVac (infecção crônica por *T. canis* e vacina tríplice viral), Vac (somente administração de vacina tríplice viral) e controle (sem infecção e sem vacina). A vacina foi aplicada em duas doses na primeira (dia zero) e segunda dose da vacina (dia 30). Diferentes letras indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

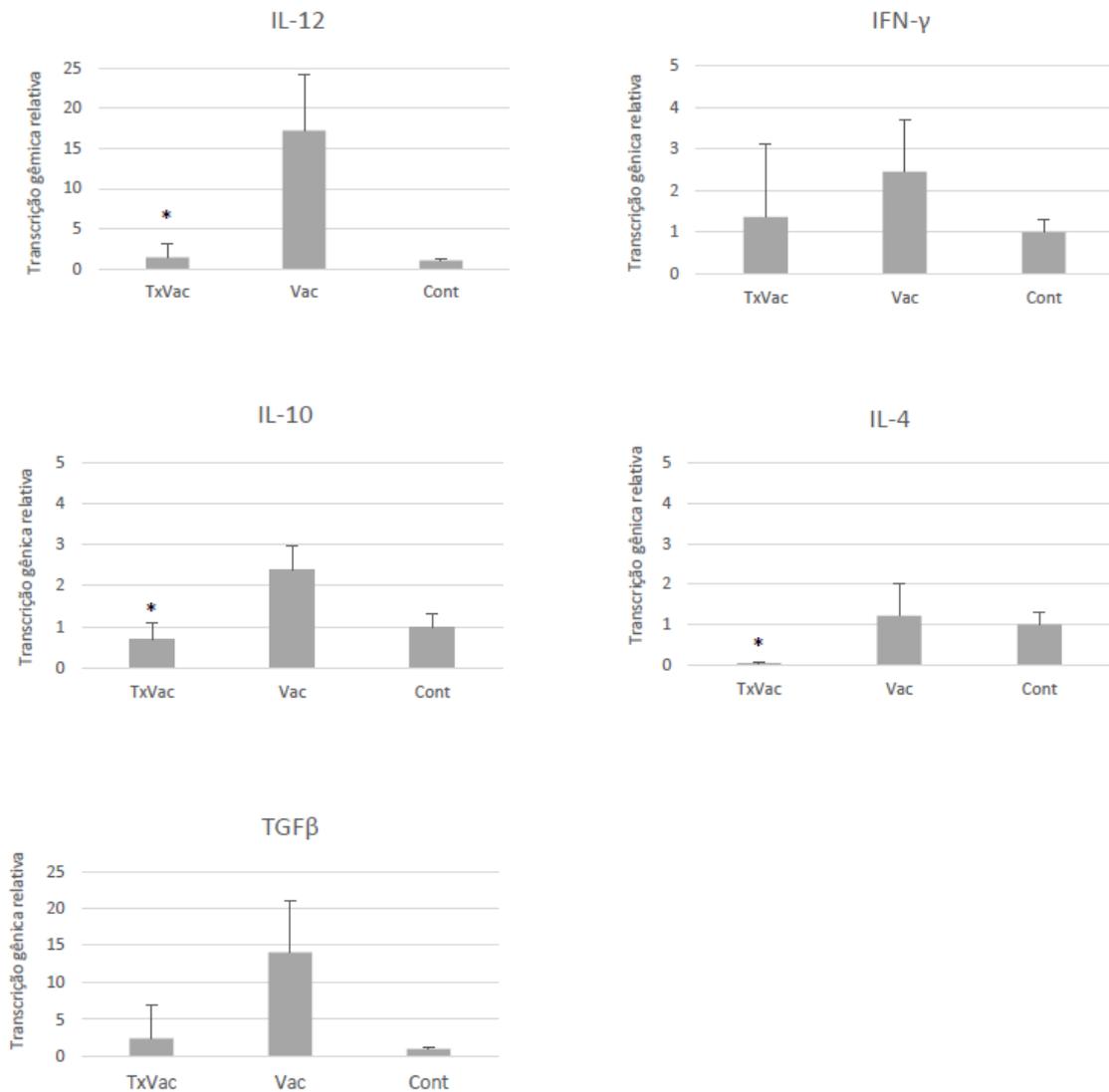


Figura 2: Média da transcrição gênica avaliadas por qPCR das citocinas *IL12*, *IFNγ*, *IL10*, *IL4* e *TGFβ* nos grupos vacinados, infectados ou não, em relação ao controle. TxVac: infecção por *T. canis* e vacina tríplice viral; Vac: Somente administração de vacina tríplice viral; Cont: sem infecção e sem vacinação. Asteriscos (*) significam diferença estatística pelo teste T de Student's ($P < 0,05$).

Em relação à resposta imune celular, podemos observar que a infecção por *T. canis* alterou os níveis de transcrição gênica das citocinas nos animais vacinados (Figura 2). Os níveis de *IL12* estavam aumentados 12 vezes nos camundongos do grupo Vac, enquanto que nos camundongos infectados do grupo TxVac os níveis desta citocina não se elevaram, permanecendo semelhantes ao controle não vacinado. Em relação à *IL10*, foi possível observar uma redução de 3,4 vezes na transcrição desta citocina nos camundongos infectados quando

comparados àqueles sem infecção. Os níveis de *IFN γ* e *TGF β* , não foram apresentaram diferenças significativas, embora os níveis de *TGF β* tenham sido 5,7 vezes mais elevados naqueles animais vacinados e sem infecção. Com relação a *IL4*, podemos observar que a vacinação não alterou esta citocina, entretanto a infecção por *T. canis* promoveu uma redução de mais de 10 vezes. Quando avaliamos a transcrição gênica das citocinas e a relação destas à intensidade de infecção, foi observada uma correlação negativa entre o número de larvas e a transcrição gênica de *IL12*, *IFN γ* , *IL10* e *IL4*, ou seja, quanto menor a transcrição gênica dessas citocinas, maior o número de larvas de *T. canis* (tabela 1).

Tabela 1: Análises de correlação dos valores de transcrição gênica das citocinas *IL12*, *IFN γ* , *IL10*, *IL4* e *TGF β* e do número de larvas recuperadas nos camundongos vacinados

Citocinas	Valores de Correl	Significado
<i>IL12</i>	-0,61	moderada negativa
<i>IFNγ</i>	-0,51	moderada negativa
<i>IL10</i>	-0,69	moderada negativa
<i>IL4</i>	-0,47	moderada negativa
<i>TGFβ</i>	-0,13	sem correlação

Discussão

Neste estudo avaliamos se a infecção crônica pelo nematódeo *T. canis*, um helminto com frequência elevada em crianças e conhecido caráter imunomodulador, poderia alterar a resposta a uma vacina do calendário básico de infantil. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a infecção crônica por *T. canis* altera a resposta imune mediada por citocinas nos animais vacinados com a vacina tríplice viral. Entretanto, os níveis de anticorpos

vacinais gerados não sofreram alteração quando comparamos ao grupo não infectado. Em contraste com os resultados obtidos em nosso estudo, Dzhivhuho e colaboradores (2018) avaliaram o impacto da infecção pelo parasito *Schistosoma mansoni* na eficácia de uma potencial vacina contra o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em camundongos. Segundo os autores, as infecções por helmintos induzem respostas Th2 que podem prejudicar as respostas Th1 geradas pela vacina contra o HIV. Os resultados mostraram redução na resposta celular e humoral nos animais infectados que receberam a vacina. A regulação negativa da resposta vacinal causada pelas células Th2 geradas pelos helmintos também foi observada por Tweyongyere e colaboradores (2019), o que resultou na diminuição da produção de anticorpos em resposta a uma vacina contra o sarampo em crianças pré-escolares infectadas por *S. mansoni*.

Algumas pesquisas que avaliaram o efeito da infecção por nematódeos intestinais na resposta vacinal foram realizadas tanto em roedores como em humanos e apresentaram resultados semelhantes ao presente estudo. A eficácia de uma candidata a vacina contra a malária foi avaliada em camundongos infectados cronicamente por *Heligmosomoides polygyrus bakeri* e foi observado que a presença deste nematoda não alterou a resposta vacinal quando comparado ao grupo controle sem infecção (Coelho *et al.*, 2019). Em relação à modulação exercida por *T. canis* sobre respostas vacinais, Menegon *et al.* (2020) observaram que a infecção pelo parasito modulou a resposta da vacina contra herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5), causador de encefalite em bovinos, promovendo redução nas citocinas *IL12*, *IL17* e *IL23*.

Carsillo e colaboradores (2009) observaram que a infecção pelo vírus do sarampo leva a uma redução na secreção de *IL12* e aumento da secreção de *IL4*, o que pode induzir uma resposta Th2 com inibição da proliferação de células T em modelo murino, contribuindo para uma supressão imunológica. Segundo Griffin (2010), durante o curso da infecção pelo sarampo, há supressão da produção de *IL12* e elevação de *IL4*, *IL10* e *IL13*, as quais persistem após a resolução da erupção cutânea. De acordo com Gans *et al.* (2008) a redução de *IL12* poderia prejudicar a aquisição da imunidade adaptativa ao sarampo, o que sugere que níveis elevados desta citocina estariam relacionados a uma melhor resposta vacinal. Ao contrário do que ocorre nas infecções virais, os antígenos vacinais presentes na vacina Priorix estimularam a produção de *IL12* nos animais sem infecção por *T. canis*. A supressão da transcrição gênica de *IL12* mediada por *T. canis* já foi relatada em outros estudos (Avila *et al.*, 2016; Moura *et al.*, 2017), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Considerando a importância da *IL12* na resposta imune efetora contra o sarampo e o fato de que foi observada uma correlação

negativa entre os níveis desta citocina e o número de larvas no hospedeiro, podemos sugerir que quanto maior o grau de infecção por *T. canis*, maior alteração da resposta imune vacinal.

Segundo Sil *et al.*, (2021), a eficácia da vacina tríplice viral está diretamente relacionada com a produção de *IFN γ* . Portanto, a observação de níveis mais reduzidos desta citocina no grupo infectado e vacinado podem indicar um prejuízo na resposta vacinal. Embora nas condições e doses avaliadas neste estudo a produção de *IFN γ* não tenha sofrido alteração significativa, os níveis desta citocina estavam duas vezes mais elevados nos animais vacinados e sem infecção, o que não ocorreu nos animais infectados.

Em relação a *IL4*, apesar da infecção crônica por *T. canis* geralmente estimular a produção desta citocina (Manzano *et al.*, 2019), neste estudo foi observada redução de *IL4* no grupo infectado. De forma semelhante, Avila e colaboradores (2016) não observaram alterações nos níveis de *IL4* em seu estudo e atribuíram os níveis reduzidos desta citocina à uma baixa dose infectante (apenas 100 ovos). A supressão de *IL4* pode prejudicar o desenvolvimento de células de defesa e produção de anticorpos (Crooke *et al.*, 2020). Desta maneira, a infecção por *T. canis*, que promoveu redução de *IL4*, poderia representar um prejuízo na imunidade protetora daqueles animais vacinados.

A expressão reduzida de *IL10* nos camundongos infectados por *T. canis* também pode sugerir um prejuízo na imunidade vacinal, visto que já foi registrada a importância desta citocina na resposta imune de doenças virais, como caxumba e rubéola (Dhiman *et al.*, 2010; Malaiyan *et al.*, 2016). Em seu estudo, Dhiman e colaboradores (2010) avaliaram o perfil da produção de citocinas em escolares que receberam duas doses da vacina contra a rubéola, tendo sido detectados baixos níveis de *IL10*. Salih (2021) observou em seu estudo que o vírus do sarampo estimula o aumento dos níveis de *IL10*, que permanecem elevados por semanas, possivelmente desempenhando um papel importante na redução das reações de hipersensibilidade e na imunidade celular que encontra-se prejudicada após o curso da infecção pelo sarampo.

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, observamos que a infecção por *T. canis* promoveu uma imunomodulação através da supressão de citocinas pró e anti inflamatórias nos animais vacinados, entretanto não houve alteração nos níveis de anticorpos vacinais. Este estudo possibilitou a obtenção de importantes resultados para conhecer a possível interferência da infecção pelo *T. canis* na resposta da vacina tríplice viral, porém, apresenta uma limitação referente ao número reduzido de camundongos utilizados. Outra limitação seria o uso da vacina como antígeno para a realização do teste de ELISA devido a impossibilidade de obtenção dos antígenos isolados de sarampo, caxumba e rubéola.

Conflito de Interesses. Não houve conflito de interesse no presente estudo.

Padrões Éticos. Os autores afirmam que todos os procedimentos que contribuem para este trabalho estão em conformidade com os padrões éticos dos guias nacionais e institucionais relevantes sobre o cuidado e uso de animais de laboratório.

Referências

Avila L et al. (2011) Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone in mice with visceral toxocariasis. *Parasitology Research*, **110**(1), p. 443–447. doi:10.1007/s00436-011-2510-5

AVILA L et al. (2016) Modulation of *IL12* and *IFN γ* by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology*. **38**, p. n/a-n/a. doi: 10.1111/pim.12314

Ballalai I et al. (2018) NOTA Técnica - NOTA TÉCNICA 16/07/2018 Sarampo: Diagnóstico, notificação e prevenção. Sociedade Brasileira de Imunizações. Disponível em <<https://sbim.org.br/images/files/nota-tecnica-conjunta-sarampo-sbimsbisbp20180716.pdf>> Acesso em 03 Mar. 2022

Brasil Ministério da Saúde (2022) Calendário Nacional de Vacinação 2022 - Criança. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/calendario-nacional-de-vacinacao-2022-crianca/view>> Acesso em 25 de janeiro de 2023.

Carsillo M, Klapproth K, Niewiesk S (2009) Cytokine Imbalance after Measles Virus Infection Has No Correlation with Immune Suppression. *Journal Of Virology*. p. 7244–7251 **83**, No. 14 0022-538X/09/\$08.000 doi:10.1128/JVI.00148-09 doi:10.1128/JVI.00148-09

Coelho CH, Guimaraes PHG, Howard J, Barnafo E, Alani NAH, Muratova O, McCormack A, Kelnhofer E, Urban Jr JF, Narum DL, Anderson C, Langhorne J, Nutman

TB, Duffy PE (2019) Chronic Helminth Infection Does Not Impair Immune Response To Malaria Transmission Blocking Vaccine Pfs230D1-EPA/Alhydrogel® In Mice. *Vaccine* **37**, Issue 8, 14. Pages 1038-1045. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.027>

Colli C. et al. (2010) Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil, *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo* **52**, p. 69–74. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200002>

Crooke SN, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Warner ND, Poland GA (2020) Associations between Markers of Cellular and Humoral Immunity to Rubella Virus Following a Third Dose of Measles-Mumps-Rubella Vaccine. *Vaccine* **38**(50): 7897–7904. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.10.071011

Dhiman N, Haralambieva I, Vierkant RA, Pankratz VS, Ryan JE, Jacobson RM, Ovsyannikova IG, Poland GA (2010) Predominant Inflammatory Cytokine Secretion Pattern in Response to Two Doses of Live Rubella Vaccine in Healthy Vaccines. *Cytokine*. **50**(1): 24–29. doi:10.1016/j.cyto.2009.12.002

Dzhivhuho G et al. (2018) Chronic schistosomiasis suppresses HIV-specific responses to DNA-MVA and MVA-gp140 Env vaccine regimens despite antihelminthic treatment and increases helminth-associated pathology in a mouse model. *PLoS Pathog*, **14**(7), e1007182. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007182>

Fakhri Y, Gasser R, Rostami A, Fan C, Ghasemi S, Javanian M et al. (2018) Toxocara Eggs In Public Places Worldwide-A Systematic Review And Meta-Analysis. *Environ Pollut.* **242**:1467–75. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.087> PMID: 30142562.

Gans HA, Yasukawa LL, Zhang CZ, Wakim RH, Rinki M, Dehovitz R, Arvin M (2008) Effects of Interleukin-12 and Interleukin-15 on Measles-Specific T-Cell Responses in Vaccinated Infants. *Viral Immunology*. **21**, Number 2. Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 163–172 doi: 10.1089/vim.2007.0113

Griffin DE (2010) Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev* **236**: 176–189. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00925.x

Hartmann W et al. (2019) Helminth Infections Suppress the Efficacy of Vaccination against Seasonal Influenza. *Cell Reports*. **29**(8), p. 2243-2256. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.051>

Helmby H (2009) Helminths and our immune system: Friend or foe?. *Parasitology International* **58**(2), p.121-127. doi: [10.1016/j.parint.2009.02.001](https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.02.001)

Hotez P, Wilkins P (2009) Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *Plos Negl Trop Dis* **3**, n.3, doi: [10.1371/journal.pntd.0000400](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400)

Johnston C et al. (2013) Helminths and immunological tolerance. *Transplantation* **0**, n. 0, p. 1-6. doi: [10.1097/TP.0b013e3182a53f59](https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182a53f59)

Johnston C et al. (2016) TGF- β in tolerance, development and regulation of immunity *Cell Immunol* **299**, p. 14-22, doi: [10.1016/j.cellimm.2015.10.006](https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.10.006)

Krotén A et al. (2016) Environmental contamination with *Toxocara* eggs and seroprevalence of toxocarosis in children of northeastern Poland. *Parasitol Res* **115**, p. 205–209. doi: [10.1007/s00436-015-4736-0](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4736-0)

Macgillivray D, Kollmann T. (2014) The role of environmental factors in modulating immune responses in early life. *Front Immunol*, 5: 434. doi: [10.3389/fimmu.2014.00434](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00434)

Maizels R et al. (2018) Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. *Immunity* **49**(5),p. 801-818. doi: [10.1016/j.immuni.2018.10.016](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.016)

Malaiyan J, Ramanan PV, Subramaniam D, Menon T (2016) Analysis of Serum Th1/Th2 Cytokine Levels in Patients with Acute Mumps Infection. *J Glob Infect Dis* **8**(2): 87–92. doi: [10.4103/0974-777X.182129](https://doi.org/10.4103/0974-777X.182129)

Malhotra I et al (2009) Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype?: A prospective birth cohort study in Kenya. *PLoS Med* **6**(7): e1000116. doi: 10.1371/journal.pmed.1000116

Manzano RAR, Cervantes RH, Araiza VHR, Arreola MIP, Castro KEN, Montor M (2019) Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. *Parasite Immunol.* **41**(12):e12672. doi: 10.1111/pim.12672. PMID: 31557337.

Mazur-Melewska K. et al. (2012) The influence of age on a clinical presentation of *Toxocara* spp. infection in children. *Ann Agric Environ Med* **19**, p. 233–236, <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600002>

Menegon Y et al. (2020) *Toxocara canis* infection may impair bovine herpesvirus type 5 immunization. *Research in Veterinary Science.* Vol. **132**, p. 268-270. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.022>

Moura MQ, Terto WDS, Jeske ST, De Castro LM, Pinto NB, Avila LFC, Leite FPL, Beme MEA (2017) Evaluation of the transcription of interleukin-12 in the intestinal mucosa of mice subjected to experimental toxocariasis and supplemented with *Saccharomyces boulardii*. *Veterinary Parasitology* **242**, p. 59-62. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.05.012

Mpairwe H et al. (2014) Pregnancy and helminth infections. *Parasite Immunol* **36**: 328-337. doi: 10.1111/pim.12101

Overgaauw PAM, Van Knapen F (2013) Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol* **193**(4):398–403. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035> PMID: 23305972.

Shaw SR, Nihal M, Ahmad N (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J.* **22**(3):659-61. doi: 10.1096/fj.07-9574LSF

Reis, C. et al. (2009) Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. BNDES Setorial, Rio de Janeiro. **29**, p. 359-392. <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2641>

Rodrigues V et al. (2014) Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. PLoS Negl Trop Dis **8**, e2567. doi: 10.1371/journal.pntd.0002567

Rostami, A.; Ebrahimi, M.; Mehravar, S., Fallah Omrani, V.; Fallahi, S.; Behniafar H. (2016) Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted helminth eggs in Mazandaran province, northern Iran. Int J Food Microbiol **225**:54–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.013> PMID: 26999768.

Salih AM (2021) Study On Some Cytokine Elevation During Measles Virus Infection In Children. Biochemical & Cellular Archives **21** Issue 1, p1601-1604. 4p. DocID: <https://connectjournals.com/03896.2021.21.1601>

Santos LM, Moura MQ, Azevedo ML, Marques GA, Avila LFC, Scaini C, Berne ME, Moreira AN, Conceição FR (2018) Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. Parasite Immunol **40**(8):e12568. doi: 10.1111/pim.12568.

Sil A, Dasgupta S, Chandra S, Datta A, Banerjee A, Das NK (2021) Changes in Cytokine Profile with Immunotherapy in Viral Warts using Purified Protein Derivative, Mumps Measles Rubella Vaccine, and Mycobacterium w Vaccine. Indian J Dermatol **66**(1):67-73. doi: 10.4103/ijd.IJD_206_20.

Su Z, Segura M, Stevenson MM (2006) Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. Infect. Immun. **74** (4), 2138–2144. doi: 10.1128/IAI.74.4.2138-2144.2006

Tweyongyere R et al. (2019) Effect of *Schistosoma mansoni* infection and its treatment on antibody responses to measles catch-up immunisation in pre-school children: A randomised trial. PLoS Negl Trop Dis **13**(2), e0007157. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007157>

Wait L, Dobson A, Graham A. (2020) Do parasite infections interfere with immunisation? A review and meta-analysis. *Vaccine*, 38, p.5582–5590. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.06.064

WHO. World Health Organization. (2015) Who's vision and mission in immunization and vaccines: 2015 - 2030. Disponível em <[https://www.who.int/publications/i/item/who-s-mission-and-vision-in-immunization-and-vaccines-\(2015-2030\)](https://www.who.int/publications/i/item/who-s-mission-and-vision-in-immunization-and-vaccines-(2015-2030))> Acesso em: 12 de agosto de 2022.

WHO. World Health Organization (2016). Media Centre. Vaccines: A global health success story that keeps us on our toes. Disponível em <<https://stopppneumonia.org/vaccines-a-global-health-success-story-that-keeps-us-on-our-toes/>> Acesso em: 15 de agosto de 2022.

Woodhall D, Eberhard M, Parise M (2014) Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxocariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **90**(5), pp. 810–813. doi:10.4269/ajtmh.13-0725

Wang X, Luo J (1998) A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *J. Helminthol* **72**. doi: 10.1017/s0022149x00016382

6. CONCLUSÃO FINAL

A partir deste estudo, conclui-se que a infecção por *T. canis* interfere na resposta vacinal de camundongos *Swiss* inoculados com a vacina tríplice viral. Quanto à resposta imune humoral, sugere-se que a infecção por *T. canis* não alterou os níveis de anticorpos vacinais, embora não tenha sido avaliada a ação específica sobre cada um dos anticorpos gerados individualmente. Entretanto, em relação a resposta imune celular, foi possível observar que a infecção por este nematódeo promoveu supressão de citocinas nos camundongos vacinados.

7. BIBLIOGRAFIA

AGHAEI, S.; RIAHI, S.M.; ROSTAMI, A.; MOHAMMADZADEH, I.; JAVANIAN, M.; TOHIDI, E., *et al.* Toxocara spp. infection and risk of childhood asthma: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.** 182:298–304. 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.022>.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. Toxocara infection in psychiatric inpatients: a case control seroprevalence study. **PloS One.** 8(4):e62606. 2013. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062606>.

AVILA, L. *et al.* Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone in mice with visceral toxocariasis. **Parasitology Research**, 110(1), p. 443–447, 2011. doi:10.1007/s00436-011-2510-5.

BALLALAI, I. *et al.* **NOTA Técnica - NOTA TÉCNICA 16/07/2018 Sarampo: Diagnóstico, notificação e prevenção.** Sociedade Brasileira de Imunizações, 2018. Disponível em <<https://sbim.org.br/images/files/nota-tecnica-conjunta-sarampo-sbimsbisbp20180716.pdf>> Acesso em 03 Mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Normas e Procedimentos para Vacinação.** Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Apenas a vacinação pode manter o Brasil longe da rubéola.** Abril, 2019. Disponível em: <<http://www.blog.saude.gov.br/index.php/promocao-da-saude/53826-apenas-a-vacinacao-pode-manter-o-brasil-longo-da-rubeola>> Acesso em: 25 de janeiro de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v.53, n.28, Julho, 2022. Disponível em <[https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no28#:~:text=Em%202020%20foram%20confirmados%208.448,6%25\)%20por%20crit%C3%A9rio%20laboratorial.](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no28#:~:text=Em%202020%20foram%20confirmados%208.448,6%25)%20por%20crit%C3%A9rio%20laboratorial.)> Acesso em 15 de novembro de 2022. Brasília, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Calendário Nacional de Vacinação 2022 - Criança. 2022.** Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/calendario-nacional-de-vacinacao-2022-crianca/view>> Acesso em 25 de janeiro de 2023.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mumps/>> Acesso em 25 de janeiro de 2023.

CEVS. **Caxumba - Situação Epidemiológica/Dados.** Centro Estadual de Vigilância em Saúde, 2023. Disponível em: <<https://www.cevs.rs.gov.br/situacao-epidemiologica-dados-588609660239f>> Acesso em 25 de janeiro de 2023.

COLLI, C. *et al.* Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil, **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, 52, p. 69–74, 2010. doi: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200002>.

COOPER P. *et al.* Human Infection with *Ascaris lumbricoides* Is Associated with Suppression of the Interleukin-2 Response to Recombinant Cholera Toxin B Subunit following Vaccination with the Live Oral Cholera Vaccine CVD 103-HgR. **Infection And Immunity**. Vol. 69, No. 3, p. 1574–1580, Mar., 2001. doi: 10.1128/IAI.69.3.1574–1580.2001.

COUPER, K. *et al.* IL10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. **PLoS Pathog**, 4: e1000004, 2008. doi: 10.1371/journal.ppat.1000004.

DA'DARA, A. *et al.* Helminth infection suppresses T-cell immune response to HIV-DNA-based vaccine in mice. **Vaccine**, 24, p. 5211–5219, 2006. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.03.078.

DE ARAÚJO, F. *et al.* Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas disease. **PLoS Negl Trop**, Dis 5, e992, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0000992.

DZHIVHUHO, G. *et al.* Chronic schistosomiasis suppresses HIV-specific responses to DNA-MVA and MVA-gp140 Env vaccine regimens despite antihelminthic treatment and increases helminth-associated pathology in a mouse model. **PLoS Pathog**, 14(7), e1007182, 2018. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007182>.

ELIAS, D; BRITTON, S; ASEFFA, A; ENGERS, H; AKUFFO, H. Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased *in vitro* TGF- β production. **Vaccine**, Jul. 23; 26 (31), p.3897-3902, 2008. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.04.083.

FAN, C.K.; HOLLAND, C.V.; LOXTON, K.; BARGHOOUTH, U. Cerebral toxocariasis: silent progression to neurodegenerative disorders? **Clin Microbiol Rev.** 28(3):663–86. 2015. doi: <https://doi.org/10.1128/CMR.00106-14>.

FAKHRI, Y.; GASSER R., ROSTAMI, A.; FAN, C.; GHASEMI, S.; JAVANIAN, M. *et al.* Toxocara Eggs In Public Places Worldwide-A Systematic Review And Meta-Analysis. **Environ Pollut.** 242:1467–75. 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.087>.

FIALHO, P.; CORRÊA, C. A Systematic Review of Toxocariasis: A Neglected but High-Prevalence Disease in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 94(6), p. 1193–1199, 2016. doi:10.4269/ajtmh.15-0733.

FIALHO, P.; CORREA, C.; LESCANO, S. Seroprevalence Brazil. **Adv Parasitol**, 109, p. 357-374, 2020. doi: 10.1016/bs.apar.2020.01.013

FLORES, E. **Virologia veterinária**. Santa Maria. Ed. UFSM. 888 p. 2007.

FLÜGGE, J. *et al.* Impact of Helminth Infections during Pregnancy on Vaccine Immunogenicity in Gabonese Infants. **Vaccines**, n. 8, p. 381, 2020. doi:10.3390/vaccines8030381.

FU, C.J. *et al.* Seroepidemiology of Toxocara canis infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infect. Dis.**, 14, p. 1–7, 2014. doi: 10.1186/1471-2334-14-261.

GYANG, P. *et al.* Seroprevalence, disease awareness, and risk factors for *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in Makoko an urban slum community in Nigeria. **Acta Trop.**, 146, p. 135–140, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.018.

HABEN, I.; HARTMANN, W.; BRELOER, M. Nematode-induced interference with vaccination efficacy targets follicular t helper cell induction and is preserved after termination of infection. **PLoS Negl Trop Dis**, vol. 8(9), p.3170, 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003170.

HAMILTON, C. *et al.* Cytokine expression. in the brains of *Toxocara canis*-infected mice. **Parasit Immunol**, v.30, n. 3, p. 181-5, 2008. doi: 10.1111/j.1365-3024.2007.01002.x.

HARTMANN, W. *et al.* Helminth Infections Suppress the Efficacy of Vaccination against Seasonal Influenza. **Cell Reports**. 29(8), p. 2243-2256, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.051>.

HASEEB, M, CRAIG, J. Suppression of the immune response to diphtheria toxoid in murine schistosomiasis. **Vaccine**, 15(1), p. 45–50, 1997. doi:10.1016/s0264-410x(96)00120-x.

HELMBY, H. Helminths and our immune system: Friend or foe?. **Parasitology International**. Jun, 58(2), p.121-127, 2009. doi 10.1016/j.parint.2009.02.001.

HOLLAND, C. Knowledge gaps in the epidemiology of *Toxocara*: the enigma remains. **Parasitology**. 144(1):81–94. 2017. doi: <https://doi.org/10.1017/S0031182015001407>.

HOTEZ; P.; WILKINS; P. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? **Plos Negl Trop Dis**, v.3, n.3, 2009. doi: 10.1371/journal.pntd.0000400.

JOHNSTON, C. *et al.* Helminths and immunological tolerance. **Transplantation** Vol. 0, n. 0, p. 1-6, 2013. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a53f59.

JOHNSTON, C. *et al.* TGF- β in tolerance, development and regulation of immunity **Cell Immunol. Jan**, 299, p. 14-22, 2016. doi: 10.1016/j.cellimm.2015.10.006.

KROTEN, A. *et al.* Environmental contamination with *Toxocara* eggs and seroprevalence of toxocarosis in children of northeastern Poland. **Parasitol Res.**, 115, p. 205–209, 2016. doi: 10.1007/s00436-015-4736-0.

KUENZLI, E.; NEUMAYR, A.; CHANEY, M., BLUM, J. Toxocariasis-associated cardiac diseases—a systematic review of the literature. **Acta Trop.** 154:107–20. 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.003>.

KURODA, E. *et al.* Suppression of macrophage interleukin-12 and tumor necrosis factor- α production in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasit Immunol**, v. 23, p.305-11, 2001. doi: 10.1046/j.1365-3024.2001.00387.x.

LEE, R. *et al.* Toxocariasis in North America: A Systematic Review. **PLoS Negl Trop Dis**, 8(8), p. 3116, 2014. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003116>.

LUNA, J.; CICERO, C.E.; RATEAU, G.; QUATTROCCHI, G.; MARIN, B.; BRUNO, E., *et al.* Updated evidence of the association between toxocariasis and epilepsy: systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis.** 12(7):e0006665. 2018. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006665> PMID: 30028858.

MACGILLIVRAY, D.; KOLLMANN, T. The role of environmental factors in modulating immune responses in early life. **Front Immunol**, 5: 434, 2014. doi: 10.3389/fimmu.2014.00434.

MAIZELS, R. *et al.* Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. **Immunity**, Nov. 20, 49(5),p. 801-818, 2018. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.016.

MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, Bruno. Highlights of human toxocariasis. **Korean J Parasitol.** 39(1):1–11. 2001. doi: <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>.

MALHOTRA, I. *et al.* Can prenatal malaria exposure produce an immune tolerant phenotype?: A prospective birth cohort study in Kenya. **PLoS Med**, Jul.6(7): e1000116, 2009. doi: 10.1371/journal.pmed.1000116.

MANZANO, R.A.R.; CERVANTES, R.H.; ARAIZA, V.H.R.; ARREOLA, M.I.P.; CASTRO, K.E.N.; MONTOR, M. Immune response to chronic *Toxocara canis* infection in a mice model. **Parasite Immunol.** 41(12):e12672. 2019. doi: 10.1111/pim.12672.

MAZUR-MELEWSKA, K. *et al.* The influence of age on a clinical presentation of *Toxocara* spp. infection in children. **Ann Agric Environ Med.**, 19, p. 233–236, 2012. doi: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600002>.

MENEGON, Y. *et al.* *Toxocara canis* infection may impair bovine herpesvirus type 5 immunization. **Research in Veterinary Science.** Vol. 132, p. 268-270, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.06.022>.

MERIGUETI, Y.F.F.B.; SANTAREM, V.A.; RAMIRES, L.M.; BATISTA, A.S., BESERRA, L.V.; NUCI, A.L., *et al.* Protective and risk factors associated with the presence of *Toxocara* spp. eggs in dog hair. **Vet Parasitol.** 244:39–43. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.020> PMID: 28917315.

MOHAMMADZADEH, I.; RIAHI, S.M.; SABER, V.; DARVISH, S.; AMROVANI, M.; AREFKHAH, N., *et al.* The relationship between *Toxocara* species seropositivity and allergic skin disorders: a systematic review and metaanalysis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 112(12):529–37. 2018. doi: <https://doi.org/10.1093/trstmh/try094> PMID: 30184239.

MOTRAN, C. *et al.* Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells *Front. Immunol.*, 9, p. 664, 2018. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00664>.

MPAIRWE, H. *et al.* Pregnancy and helminth infections. **Parasite Immunol** 36: 328-337. 2014. doi: 10.1111/pim.12101.

NAYAKWADI SINGER, M. *et al.* Pneumococcal Vaccine Response After Exposure to Parasites in Utero, in Infancy, or Mid-Childhood. **Pediatrics**. Vol. 139(4), e20162781, 2017. doi: 10.1542/peds.2016-2781.

NOLAND, G. *et al.* Helminth infection impairs the immunogenicity of a Plasmodium falciparum DNA vaccine, but not irradiated sporozoites. **Vaccine**, Apr. 9; 28 (17), p. 2917-2923, 2010. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.055.

NOOKALA, S. *et al.* Impairment of tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human lymphatic filariasis. **Infect Immun**, 72(5), p. 2598-2604, 2004. doi:10.1128/iai.72.5.2598-2604.2004.

OVERGAAUW, P. A. M.; VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Vet Parasitol**. 193(4):398–403. 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035> PMID: 23305972.

PARISE, M.; HOTEZ, P.; SLUTSKER, L. Neglected Parasitic Infections in the United States: Needs and Opportunities. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 90(5), p. 783–785, 2014. doi:10.4269/ajtmh.13-0727.

PINELLI, E. *et al.* *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Exp Parasitol**, v. 115, p.76-82, 2007. doi: 10.1016/j.exppara.2006.06.002.

REIS, C. *et al.* Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar., 2009. <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2641>.

RODRIGUES, V. *et al.* Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. **PLoS Negl Trop Dis**. 8, e2567, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002567.

ROSTAMI, A.; EBRAHIMI, M.; MEHRAVAR, S., FALLAH OMRANI, V.; FALLAHI, S.; BEHNIAFAR H. Contamination of commonly consumed raw vegetables with soil transmitted

helminth eggs in Mazandaran province, northern Iran. **Int J Food Microbiol.** 225:54–8. 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.013>.

SCHOENARDIE, E. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara* infection in children from southern Brazil. **J Parasitol.**, 99, p. 537-9, 2013. doi: 10.1645/GE-3182.

SU, Z.; SEGURA, M.; STEVENSON, M.M. Reduced protective efficacy of a blood-stage malaria vaccine by concurrent nematode infection. **Infect. Immun.** 74 (4), 2138–2144. 2006. doi: 10.1128/IAI.74.4.2138-2144.2006.

TWEYONGYERE, Robert *et al.* Effect of *Schistosoma mansoni* infection and its treatment on antibody responses to measles catch-up immunisation in pre-school children: A randomised trial. **PLoS Negl Trop Dis**, 13(2), e0007157, 2019. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007157>.

VAN RIET, E.; HARTGERS, F.C., YAZDANBAKHS, M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. **Immunobiology**, 212, p. 475-490, 2007. doi: 10.1016/j.imbio.2007.03.009.

WAIT, L.; DOBSON, A.; GRAHAM, A. Do parasite infections interfere with immunisation? A review and meta-analysis. **Vaccine**, 38, p.5582–5590, 2020. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.06.064.

WHO. World Health Organization. (2015) **Who's vision and mission in immunization and vaccines: 2015 - 2030**. Disponível em <[https://www.who.int/publications/i/item/who-s-mission-and-vision-in-immunization-and-vaccines-\(2015-2030\)](https://www.who.int/publications/i/item/who-s-mission-and-vision-in-immunization-and-vaccines-(2015-2030))> Acesso em: 12 de agosto de 2022.

WHO. World Health Organization (2016). Media Centre. **Vaccines: A global health success story that keeps us on our toes**. Disponível em <<https://stopppneumonia.org/vaccines-a-global-health-success-story-that-keeps-us-on-our-toes/>> Acesso em: 15 de agosto de 2022.

WOODHALL, D.; EBERHARD, M.; PARISE, M. Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxocariasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 90(5), pp. 810–813, 2014. doi:10.4269/ajtmh.13-0725.

8. APÊNDICE 1

MANUSCRITO 2

A ser submetido na revista Parasitology Research.

Efeito nematicida de produtos químicos utilizados na desinfecção de alimentos contaminados com ovos embrionados de *Toxocara canis*

Nematicidal effect of chemicals used to disinfect food contaminated with embryonated eggs of *Toxocara canis*

RESUMO

As infecções por helmintos ocorrem principalmente pela ingestão de ovos infectantes ao consumir frutas e vegetais crus sem lavagem adequada. Estudos têm avaliado a presença de parasitos em solo e fezes, destacando o nematódeo *Toxocara canis*, causador da toxocaríase, como um dos principais geohelmintos encontrados. Os ovos de *T. canis* contaminam diferentes vegetais, portanto a descontaminação dos alimentos que serão consumidos crus é indispensável para prevenir a infecção por estes parasitos. Neste estudo avaliamos a eficácia de agentes químicos utilizados na descontaminação de alimentos como medida profilática contra a infecção por *T. canis*. Fêmeas adultas de *T. canis* foram recuperadas através do tratamento com palmoato de pirantel (15 mg/kg) de cães jovens e submetidas a histerectomia para obtenção de ovos não embrionados, que foram incubados para que ocorresse o embrionamento. Foram testadas as seguintes soluções: hipoclorito de sódio 5% e 10%, água sanitária 0,75 e 1,5%, ácido tricloro isocianúrico 0,1% e vinagre de vinho branco, todas em 30 minutos e 16 horas de exposição, além de um tratamento controle para cada tempo. O hipoclorito de sódio 5% e 10% se mostrou eficaz em 30 minutos de exposição, promovendo decorticação em 93,5% dos ovos e ruptura em 99,8% dos ovos, respectivamente, enquanto que a água sanitária, o ácido tricloro isocianúrico e o vinagre não demonstraram resultados positivos, apresentando mais de 97% de ovos íntegros em todos os tratamentos. Concluímos que a resistência dos ovos de *T. canis* dificulta a descontaminação, ressaltando a necessidade de pesquisas contínuas para identificar produtos eficazes na descontaminação de alimentos.

Palavras-chave: Toxocara, desinfetantes, vegetais.

Introdução

Os parasitos intestinais representam um grave problema de saúde pública que afeta mais de 25% da população global (Li et al. 2020). No Brasil, a alta prevalência de enteroparasitoses, principalmente em regiões com nível socioeconômico mais baixo, está relacionada principalmente às condições precárias de higiene, à falta de saneamento básico, além da falta de cuidado na manipulação dos alimentos (Rodrigues et al. 2020). Uma das principais formas de infecção por helmintos é a ingestão de ovos infectantes pelos seres humanos, especialmente ao consumir frutas e vegetais crus sem uma lavagem adequada (Adenusi et al. 2015). Estudos vêm sendo realizados ao longo dos anos para avaliar a presença de parasitos em amostras de solo e fezes humanas e de animais. Dentre os principais geohelmintos que contaminam o solo, o nematódeo *Toxocara canis*, principal agente etiológico da toxocaríase, é frequentemente identificado pelos autores como causador de contaminação (Mizgajska-Wiktor et al. 2017; Mazhab-Jafari et al. 2019; Healy et al. 2021; Paller et al. 2021).

A principal via de transmissão humana da toxocaríase é a fecal-oral, através da ingestão de ovos de *T. canis* presentes no solo ou alimentos contaminados (Fakhri et al. 2018). As hortaliças cruas ou mal lavadas, contaminadas com resíduos fecais ou irrigadas com água contaminada com formas parasitárias, representam importantes veículos de transmissão de parasitoses intestinais humanas (Fernandes et al. 2015). Os ovos de *Toxocara spp.* contaminam diferentes tipos de vegetais (Healy et al. 2021), portanto a descontaminação adequada dos alimentos que serão consumidos crus é uma importante medida profilática que deve ser adotada para a prevenção da infecção por estes parasitos. Os ovos de *T. canis* são altamente resistentes a condições ambientais adversas e desinfetantes químicos usados rotineiramente (Von Dohlen et al. 2017). Na tabela 1 podemos observar alguns estudos mais recentes realizados mundialmente que apontam os principais parasitos presentes em fontes de água, no solo e em fezes humanas e de animais, com um destaque para o encontro de ovos de *T. canis*.

Tabela 1 - Estudos com amostras de solo, fezes e água quanto a presença de helmintos.

Amostra	N	Local	Resultado	Referência
Solo	150	Irã	18% positivas para <i>T. canis</i>	Mazhab-Jafari et al. (2019)
Água	39	Tunísia	97% positivas para <i>Giardia spp.</i> ; <i>Entamoeba histolytica/dispar/moshkovskii</i> ; <i>Entamoeba coli</i> e <i>Ascaris spp.</i>	Ayed et al. (2018)
Solo e fezes humanas	582	Camarões	Solo: 2%, <i>Ascaris</i> , 1% <i>Trichuris</i> e 0,3% <i>Ancilostomídeos</i> . Fezes: 4,95% <i>A. Lumbricoides</i> .	Tchakounté et al. (2018)
Água	29	Índia	52% de ovos de helmintos	Grego et al. (2018)
Solo e fezes caninas	285	Portugal	53% amostras de solo e 5,9% amostras de fezes com <i>T. canis</i>	Otero et al. 2018
Solo	3309	Polônia	14,9% ovos de <i>Toxocara spp.</i>	Mizgajska-Wiktor et al. 2017
Fezes caninas	1121	Argentina	8,9% parasitos intestinais (<i>Toxocara spp.</i> , <i>Toxascaris leonina</i> e <i>Trichuris vulpis</i>)	Ávila et al. 2023
Solo	40	Brasil	52,5% ancilostomídeos e 47,2% <i>Blastocystis hominis</i>	Oliveira et al. 2021

Autores vêm estudando sobre a eficácia de agentes químicos para reduzir a viabilidade de ovos de helmintos como forma de prevenção de parasitoses. Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de testar a eficácia de substâncias químicas sobre ovos e larvas de helmintos, para que fossem utilizadas sobre superfícies ou na lavagem de alimentos, porém os resultados são heterogêneos. Ursache et al. (2019) avaliaram o efeito de seis produtos desinfetantes comumente usados em canis, clínicas veterinárias e produtos de limpeza doméstica, sobre a viabilidade e o embrionamento de ovos de *T. canis*, porém nenhum dos produtos testados foi eficaz. El-Dakhly et al. (2018) testaram seis desinfetantes comercializados, avaliando seu efeito sobre o embrionamento e desenvolvimento larval de ovos

de *Toxascaris leonina* e concluíram que o desinfetante Virkon® foi eficaz contra os ovos do parasito. Beyhan et al. (2016) investigaram os efeitos do ácido acético em ovos de *Ascaris lumbricoides* (*A. lumbricoides*) e observaram que o tratamento direto das hortaliças com vinagre de ácido acético a 5% por 30 minutos é imprescindível para uma proteção ativa contra este parasito, pois o produto promoveu a perda viabilidade em 100% dos ovos. Três produtos disponíveis para lavagem de hortaliças foram testados quanto a sua capacidade larvicida contra *Angiostrongylus cantonensis*, porém nenhum deles foi mais eficaz do que lavar e enxaguar os alimentos apenas com água corrente (Yeung et al. 2013).

Apesar dos resultados mostrarem a eficácia de determinados produtos químicos sobre a inviabilidade de ovos/larvas de helmintos e cistos/oocistos de protozoários, muitos deles não são destinados para este fim e nem podem ser utilizados para a descontaminação de vegetais para consumo *in natura*. Sendo assim, torna-se importante que esses agentes químicos sejam avaliados como descontaminantes de alimentos, principalmente porque o mercado dispõe de produtos detergentes e desinfetantes, mas nenhum antiparasitário específico para a profilaxia das helmintoses. Diante disso, o presente estudo avaliou a eficácia de agentes químicos utilizados como descontaminantes de alimentos.

Material e Métodos

Para a recuperação de formas adultas de *T. canis*, cães com quatro a oito semanas de idade foram tratados com o anti-helmíntico palmoato de pirantel (15 mg/kg) por via oral (Avila 2011). A seguir, foi realizada a histerectomia das fêmeas do parasito para a obtenção de ovos não embrionados. Os ovos foram incubados em formalina a 2%, sendo mantidos a uma temperatura de 28°C, umidade relativa do ar superior a 80%, sob aerações diárias, durante 30 dias, para a obtenção da forma infectante (Avila 2011). Após a incubação, os ovos embrionados foram lavados em solução fisiológica a 0,85%, com sucessivas centrifugações a 2.000 g por três minutos, para a remoção da formalina.

As seguintes soluções foram testadas, cada uma delas por 30 minutos ou 16 horas de exposição: Solução de hipoclorito de sódio a 5% e 10% (Vetec), água sanitária a 0,75% e 1,5% (Qboa), ácido tricloro isocianúrico a 0,1% (MixKill Verd) e vinagre de vinho branco (puro) (Vega). Foi realizado um tratamento controle para cada um dos tempos de exposição, utilizando água destilada. Para cada tratamento, aproximadamente, 20.000 ovos de *T. canis* foram

expostos a um agente químico, e nos controles os ovos foram expostos a água destilada. Cada tratamento e cada controle tiveram 10 repetições, sendo que cada uma das repetições foi realizada simultaneamente.

Após o período dos tratamentos, os ovos foram lavados com solução fisiológica a 0,85%, a 2.000 g por três minutos para a remoção dos agentes químicos. De cada repetição foram colhidos 100 ovos (em duplicata) para avaliação das alterações morfológicas e motilidade em microscópio óptico (aumento de 40x). Os resultados referentes à viabilidade foram analisados através do teste de Qui-quadrado, com nível de significância de 0,05.

Resultados

No período de exposição de 30 minutos, os tratamentos com água sanitária a 0,75% e 1,5%, ácido tricloro isocianúrico 0,1% e vinagre de vinho branco, não apresentaram efeito, uma vez que apresentaram integridade dos ovos acima de 97%, semelhante ao controle. O único produto que se mostrou eficaz na inviabilidade dos ovos foi o hipoclorito de sódio, nas duas concentrações (5%, e 10%) (**Tabela 2**).

TABELA 2 – Tratamentos com diferentes agentes químicos, sobre ovos embrionados de *T. canis*, com 30 minutos e 16 horas de exposição.

Agente Químico	Ovos Íntegros (%)		Ovos Decorticados (%)		Ovos Rompidos (%)		Total (%)	
	30min	16h	30min	16h	30min	16h	30min	16h
Água sanitária 0,75%	98,3	98,2	zero	0,2	1,7	1,6	100	100
Água sanitária 1,5%	97,4	97,3	zero	0,4	2,6	2,3	100	100
Ácido tricloro isocianúrico 0,1%	98,0	98,0	2,0	2,0	zero	zero	100	100
Vinagre puro	97,2	98,0	zero	zero	2,8	2,0	100	100
Hipoclorito de sódio 5%	zero	zero	93,5	56,1	6,5	43,9	100	100
Hipoclorito de sódio 10%	0,2	zero	zero	4,1	99,8	95,9	100	100
Controle	99,9	99,1	zero	0,8	0,1	0,1	100	100

Na tabela 2 é possível verificar que o tratamento com hipoclorito de sódio 5%, após 16 h, promoveu decorticação em 56,1% dos ovos e ruptura de todas as camadas em 43,9%, enquanto que com o tratamento com hipoclorito de sódio 10% foi possível observar um grande número de ovos rompidos (99,8%) em apenas 30 minutos de exposição. Os demais tratamentos, mesmo com 16 h de exposição, não promoveram alteração da morfologia dos ovos. Na figura 1 podem ser observadas as alterações morfológicas sobre os ovos de *T. canis*.

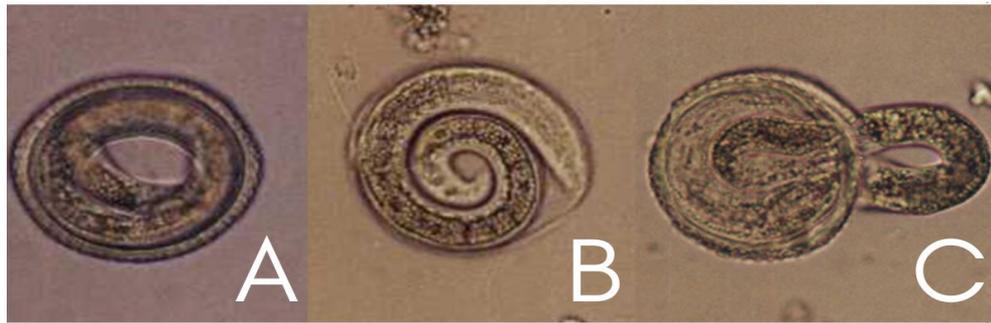


Figura 1: Morfologia dos ovos do *T. canis* após os tratamentos com desinfetantes. A) ovo de *Toxocara canis* íntegro após tratamento com água sanitária a 1,5%, com 30 min de exposição; B) ovo de *T. canis* decorticado após tratamento com hipoclorito de sódio 5%, com 30 min de exposição; C) rompimento da membrana do ovo após tratamento com hipoclorito de sódio 10%, com 30 min de exposição (aumento de 400x).

Discussão

Após a análise dos resultados obtidos, observamos que os produtos testados apresentaram diferenças quanto a sua eficácia no que se refere ao princípio ativo do agente químico utilizado e ao tempo de exposição. Os tratamentos com água sanitária 0,75% e 1,5%, em 30 minutos e 16 horas de exposição, apresentaram índices de integridade dos ovos acima de 97%, o que representa ineficácia das soluções. Von Dohlen et al. (2017) avaliaram que a Lixívia (hipoclorito de sódio à 5,25%), também não foi eficaz na inviabilidade de ovos de *T. canis*, tendo observado larvas vivas no interior dos ovos em todos os grupos tratados por 15, 30, 60 e 120 minutos, e após exposição contínua por 18 dias, confirmando que os ovos de *T. canis* são resistentes ao tratamento com o alvejante. A resistência dos ovos de *T. canis* está associada, provavelmente, à presença da membrana proteica, localizada na camada externa da casca do ovo, o que dificulta a ação de produtos químicos.

Quando foram testadas concentrações de hipoclorito de sódio maiores (5% e 10%) do que os tratamentos com água sanitária, que também tem como princípio ativo o hipoclorito de sódio, foi observado que 100% dos ovos não se mantiveram íntegros, após 30 minutos e 16 horas de exposição. El-Dakhly et al. (2018) testaram seis desinfetantes comercializados e avaliaram seu efeito sobre o embrionamento e desenvolvimento larval de ovos de *Toxascaris leonina*. Houve uma redução de 100% no desenvolvimento larval com o uso de Dettol® e

Virkon®, sendo que o primeiro resultou em ovos com cascas deformadas e uma interrupção no desenvolvimento embrionário uma semana após a exposição. Todos os ovos tratados com Virkon® mostraram lise embrionária precoce apenas 24 horas após a exposição, sendo este o desinfetante mais eficaz contra os ovos de *Toxascaris*. Tanto o germicida TH4+ (à base de glutaraldeído, cloretos de amônio quaternário, terpineol e óleo de pinho) quanto o etanol a 70% tiveram um impacto significativo ($P \leq 0,05$) no desenvolvimento larval, o que não ocorreu com o hipoclorito de sódio e o fenol. O hipoclorito de sódio causou decorticação dos ovos, assim como em nosso estudo, enquanto os ovos de *Toxascaris* embrionados tratados com fenol pareciam não apresentar alterações morfológicas. Landry et al. 2021 observaram uma eficácia de 82,51% do hipoclorito de sódio na redução da viabilidade dos ovos de *Hymenolepis nana*. Os autores testaram a eficácia de outros três desinfetantes sobre viabilidade de ovos de *H. nana* e observaram que o hipoclorito de cálcio apresentou maior eficácia na redução da viabilidade dos ovos, seguido do peróxido de hidrogênio, hipoclorito de sódio e um produto a base de gesso (Gypsum).

O vinagre de vinho branco (puro), apesar de ser comumente utilizado no preparo de vegetais consumidos crus, não foi eficaz sobre ovos de *T. canis*. Na ilha do Havaí, autores avaliaram três produtos domésticos prontamente disponíveis como soluções de lavagem para remover moluscos gastrópodes infectados com *Angiostrongylus cantonensis*, causador de angiostrongilíase. As soluções testadas na lavagem de hortaliças (alface) foram ácido acético (vinagre), hipoclorito de sódio (Lixívia) e cloreto de sódio (sal doméstico) quanto à sua capacidade de matar larvas de moluscos gastrópodes. Nenhum dos produtos foi mais eficaz do que lavar e enxaguar apenas com água corrente. A maioria dos moluscos gastrópodes foram removidos após o tratamento, mas alguns permaneceram na alface mesmo após a lavagem e enxágue do produto. Segundo os autores, apenas lavar enxaguar o produto e depois enxaguar cada folha individualmente resultou na remoção completa de todos os moluscos gastrópodes (Yeung et al. 2013). Beyhan et al. (2016) investigaram os efeitos do ácido acético em ovos de *A. lumbricoides* para determinar a concentração efetiva de vinagre e o período de implementação para tornar o consumo de vegetais crus mais confiável. Os resultados mostraram que somente o tratamento com ácido acético na proporção de 4,8% em 30 minutos ou na proporção de 4,3% em 60 minutos foi eficaz. Os autores concluíram que para obter uma proteção ativa, após a lavagem das hortaliças, é imprescindível o tratamento direto com vinagre de ácido acético a 5% por 30 minutos.

A solução de ácido tricloro isocianúrico 0,1% (MixKill Verd), que é indicada em cozinhas industriais e hospitais como desinfetante de frutas e hortaliças e apresenta ação bactericida, também não foi eficaz em relação a promoção de alterações morfológicas dos ovos de *T. canis*, tanto em 30 minutos de exposição como em 16 horas. Ursache et al. (2019) avaliaram o efeito de seis produtos desinfetantes comumente usados em canis, clínicas veterinárias e produtos de limpeza doméstica sobre a viabilidade e o embrionamento de ovos de *T. canis*, incluindo hipoclorito de sódio, além de misturas de compostos químicos com glutaraldeído, amônio quaternário, cloretos, propanol, etanol, sulfato, sódio, ácidos, dentre outros. Após a diluição, os desinfetantes testados obtiveram a concentração máxima recomendada pelo fabricante para obter um efeito biocida. Cada produto foi testado em aproximadamente 10.000 ovos de *T. canis*, com cinco tempos de contato diferentes (5, 10, 15, 30, 60 min). Três réplicas foram testadas para cada desinfetante diluído e para cada tempo de contato. Nenhum dos produtos testados teve efeito inibitório significativo na embriogênese e na viabilidade dos ovos de *T. canis*, independentemente do tempo de contato.

Pode-se observar, também, que não houve diferença significativa em relação ao tempo de exposição dos ovos de *T. canis* aos agentes químicos, ou seja, mesmo aumentando o tempo de exposição não houve maior eficácia do produto.

Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste estudo, concluímos que o hipoclorito de sódio foi o único desinfetante eficaz, tanto no tratamento com 30 minutos quanto em 16 horas de exposição, porém não representa uma solução na profilaxia da toxocaríase pois o uso deste produto na lavagem dos alimentos inviabiliza o seu consumo devido a sua alta concentração química. O tratamento com vinagre, produto frequentemente utilizado na descontaminação de hortaliças, sendo popularmente indicado para este fim, não demonstrou resultados positivos em nenhum dos tempos de exposição, o que serve de alerta para os indivíduos que o utilizam. A dificuldade na descontaminação dos alimentos se deve à resistência dos ovos do parasito, o que demonstra a necessidade de continuarem as pesquisas por produtos eficazes que possam ser utilizados pela população no seu dia-a-dia e também por profissionais que atuam nas cozinhas industriais e hospitalares.

Referências

- Adenusi AA, Abimbola WA, Adewoga TO (2015) Human intestinal helminth contamination in pre-washed, fresh vegetables for sale in major markets in Ogun State, southwest Nigeria. *Food Control*. 50, 843–849. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.033>
- Ayed LB, Belhassen K, Sabbahi S, Karanis P, Nouiri I (2018) Assessment of the parasitological quality of water stored in private cisterns in rural areas of Tunisia. *J Water Health*. 16(5):737-749. doi: 10.2166/wh.2018.117.
- Avila L. et al. (2011) Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone in mice with visceral toxocariasis. **Parasitology Research**, 110(1), p. 443–447. doi:10.1007/s00436-011-2510-5
- Avila HG, Sandon L, Anes PE, Meli SA, Giboin GA, Pérez VM, Periago MV (2023) Environmental *Toxocara* spp. presence in crowded squares and public parks from San Juan Province, Argentina: A call for a "One Health" approach. *Front Med (Lausanne)*. 17;10:1102396. doi: 10.3389/fmed.2023.1102396.
- Beyhan YE, Yilmaz H, Hokelek M (2016) Effects of acetic acid on the viability of *Ascaris lumbricoides* eggs. Is vinegar reliable enough to clean the vegetables? *Saudi Med J*. 37(3):288-92. doi: 10.15537/smj.2016.3.13061.
- El-Dakhly KM, Aboshinaf ASM, Arafa WM, Mahrous LN, El-Nahass E, Gharib AF, Holman PJ, Craig TM (2018) In vitro study of disinfectants on the embryonation and survival of *Toxascaris leonina* eggs. *J Helminthol*. 92(5):530-534. doi: 10.1017/S0022149X17000839
- Fakhri Y, Gasser R, Rostami A, Fan C, Ghasemi S, Javanian, M *et al.* (2018) *Toxocara* Eggs In Public Places Worldwide-A Systematic Review And Meta-Analysis. *Environ Pollut*. 242:1467–75. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.087>
- Fernandes NS, Guimarães HR, Amorim ACS, Reis MB, Trindade RA, Melo ACFL (2015) Avaliação parasitológica de hortaliças: da horta ao consumidor final. *Revista Saúde e Pesquisa*, vol. 8, no. 2, pp. 255-265. <http://dx.doi.org/10.17765/1983-1870.2015v8n2p255-265>

Grego S, Barani V, Hegarty-Craver M, Raj A, Perumal P, Berg AB, Archer C (2018) Soil-transmitted helminth eggs assessment in wastewater in an urban area in India. *J Water Health*. 16(1):34-43. doi: 10.2166/wh.2017.147.

Healy SR, Morgan ER, Prada JM, Betson M. (2021) Brain food: rethinking food-borne toxocariasis. *Parasitology*. doi: 10.1017/S0031182021001591

Landry FKA, Aghaindum AG, Dennis AI, Nadège OAT, Pierre TN (2021) Evaluation of the efficiency of some disinfectants on the viability of *Hymenolepis nana* eggs isolated from wastewater and faecal sludge in Yaounde (Cameroon): importance of some abiotic variables. *Water Sci Technol*. 84(9):2499-2518. doi: 10.2166/wst.2021.367.

Li J, Wang Z, Karim MR, Zhang L, (2020) Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasites & Vectors*, vol. 13, no. 380, pp. 1-19. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-020-04255-3>

Mizgajska-Wiktor H, Jarosz W, Fogt-Wyrwas R, Drzewiecka A (2017) Distribution and dynamics of soil contamination with *Toxocara canis* and *Toxocara cati* eggs in Poland and prevention measures proposed after 20 years of study. *Vet Parasitol*. 30;234:1-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.12.011. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.12.011

Mazhab-Jafari K, Zibaei M, Maraghi S, Rouhandeh R, Helichi M, Ghafeli-Nejad M, Zangeneh S, Farhadiannezhad M (2019) Prevalence of *Toxocara* eggs in the soil of public parks of Khorramshahr city, southwest Iran. *Ann Parasitol*. 65(4):351–356. doi: 10.17420/ap6504.220.

Oliveira BL, Junior JCA, Nascimento JLS, Pinto LC (2021) Parasitic contamination in the soil of public parks from northern Brazil. *Ann Parasitol*. 67(2):287-294. doi: 10.17420/ap6702.341.

Otero D, Alho AM, Nijse R, Roelfsema J, Overgaauw P, Carvalho LM (2018) Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *J Infect Public Health*. 11(1):94-98. doi: 10.1016/j.jiph.2017.05.002.

Paller V, Macalinao-Ramirez C, Bandal M (2021) Environmental contamination with parasites in selected rural farms in the Philippines: impacts of farming practices on leafy greens food safety. *Parasitology*. 1-8 doi: 10.1017/S0031182021002031

Rodrigues AC, Da Silva MDC, Pereira RS, Pinto LC (2020) Prevalence of contamination by intestinal parasites in vegetables (*Lactuca sativa* L. and *Coriandrum sativum* L.) sold in markets in Belém, northern Brazil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 100, no. 7, pp. 2859-2865. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.10265>

Tchakounté BN, Nkouayep VR, Poné JW (2018) Soil Contamination Rate, Prevalence, Intensity of Infection of Geohelminths and Associated Risk Factors among Residents in Bazou (West Cameroon). *Ethiop J Health Sci*. 28(1):63-72. doi: 10.4314/ejhs.v28i1.8.

Ursache AL, Mircean V, Dumitrache M, Andrei S, Ștefănuț S, Cozma V, Cătană R, Cernea M (2019) Is routine disinfection efficient in preventing contamination with *Toxocara canis* eggs? *J Helminthol*. 12;94:e60. doi: 10.1017/S0022149X1900052X.

Von Dohlen AR, Houk-Miles AE, Zajac AM, Lindsay DS (2017) Flotation of *Toxocara canis* Eggs in Commercial Bleach and Effects of Bleach Treatment Times on Larval Development in These Eggs. *J Parasitol*. 103(2):183-186. doi: 10.1645/16-123

Yeung NW, Hayes KA, Cowie RH (2013) Effects of washing produce contaminated with the snail and slug hosts of *Angiostrongylus cantonensis* with three common household solutions. *Hawaii J Med Public Health*. 72(6 Suppl 2):83-6.

9. ANEXO 1

COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Universidade Federal do Rio Grande
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - PROPESP
 ceua@furg.br http://www.propesp.furg.br

CEUA

CERTIFICADO Nº P011/2020



Certificamos que o projeto intitulado "Influência da infecção por nematódeo *Toxocara canis* sobre a resposta da vacina tetraviral em modelo murino", protocolo nº 23116.009861/209-70, sob a responsabilidade de Luciana Farias da Costa Avila - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa – 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 EM USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE (CEUA-FURG), em reunião de 03 de março de 2020 (Ata 002/2020).

A CEUA lembra aos pesquisadores que qualquer alteração no protocolo experimental ou na equipe deve ser encaminhada à comissão para avaliação e aprovação. Um relatório final deve ser enviado à CEUA no término da vigência do seu projeto.

CEUA Nº	Pq029/2019
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Paula Teixeira Chaves; Marcia Cristiane Feltrin Dias de Souza; Lourdes Helena Rodrigues Martins; Micaele Quintana de Moura
VIGÊNCIA DO PROJETO	30/12/2021
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	<i>Mus musculus</i> – swiss
NÚMERO DE ANIMAIS	70
PESO/ IDADE	4-6 semanas 30 g
SEXO	Fêmea
ORIGEM	Biotério Setorial da Faculdade de Medicina - FURG
ENVIO DO RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro 2021
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Janeiro de 2022

Rio Grande, 03 de março de 2020.

Med. Vet. Alice Teixeira Meirelles Leite
 Coordenadora da CEUA-FURG



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA SESSÃO DE DEFESA ABERTA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

A banca examinadora, designada pela Portaria nº 2238/2023 de 07 de agosto de dois mil e vinte e três, em sessão presidida e registrada pela orientadora, Profa. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila, reuniu-se no dia quinze de agosto de dois mil e vinte e três, às 9h, por meio de videoconferência (<https://conferenciaweb.rnp.br/sala/luciana-luciana-farias-da-costa-de-avila>), para avaliar a Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, intitulada: **“Influência da infecção pelo nematódeo *Toxocara canis* sobre a resposta da vacina contra sarampo, caxumba e rubéola em modelo murino.”** do(a) doutorando(a) Paula Teixeira Chaves. Para o início dos trabalhos, a Senhora Presidente procedeu à abertura oficial da sessão, com a apresentação dos membros da banca examinadora. A seguir, prestou esclarecimentos sobre a dinâmica de funcionamento da sessão, concedendo o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para a apresentação da tese pela doutoranda, que iniciou às 09 horas e 22 minutos e terminou às 12 horas e 43 minutos. Após a apresentação, passou a palavra aos membros da banca examinadora, para que procedessem à arguição e apresentassem suas críticas e sugestões. Ao término dessa etapa de avaliação, de acordo com os membros da banca examinadora, a tese de doutorado avaliada foi APROVADA.

Rio Grande, 15 de agosto de 2023.

Profa. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila (Orientadora – FURG)

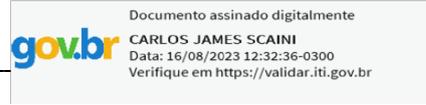
Luciana F. de Avila

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Externo – UFPel)

Fábio P. Leite
Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite
Fábio Pereira Leivas Leite
Médico Veterinário Ph.D.
CRMV/RS 2027/2023/2024/2025

Profa. Dra. Talita Bandeira Roos (Externo - UFPA)

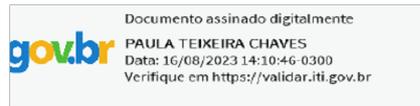
Prof. Dr. Carlos James Scaini (Titular – FURG)



Documento assinado digitalmente
gov.br VANUSA POUSADA DA HORA
Data: 15/08/2023 16:26:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Vanusa Pousada da Hora (Suplente – FURG)

Ciente: _____



Paula Teixeira Chaves - Doutorando(a) FURG