



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

AIDA YISELA OVIEDO VERA

**TRANSMISSÃO CONGÊNITA DA TOXOCARIÁSE.
CINÉTICA DE IgG ANTI-*TOXOCARA* SPP. E SUA
ASSOCIAÇÃO COM ATOPIA E ASMA EM CRIANÇAS DE
UM COORTE DE ESTUDO NO MUNICÍPIO DE QUININDÉ,
EQUADOR**

Salvador, BA
2017

AIDA YISELA OVIEDO VERA

**TRANSMISSÃO CONGÊNITA DA TOXOCARIÁSE.
CINÉTICA DE IgG ANTI-*TOXOCARA* SPP. E SUA
ASSOCIAÇÃO COM ATOPIA E ASMA EM CRIANÇAS DE
UM COORTE DE ESTUDO NO MUNICÍPIO DE QUININDÉ,
EQUADOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Imunologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Neuza Maria Alcântara Neves

Co-orientador: Prof. Dr. Phillip Cooper

Salvador, BA
2017

Aos meus pais, Angel e Bethy, que me deram a vida e educação. Aos meus irmãos, Angel, Ronny, Daniela, sobrinhos, a todos que estiveram ao meu lado e, de alguma forma, me apoiaram e auxiliaram na realização de mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu cuidado de pai, por ter me ajudado a superar os obstáculos e a concluir meu trabalho.

À minha prezada orientadora, Neuza Maria Alcântara Neves, por sua grande ajuda e colaboração, por ter me acolhido, de modo a fazer parte de seu laboratório, e permitir-me a obter novos conhecimentos. Quero lhe agradecer de coração pelos ensinamentos dirigidos durante o curso do trabalho, pela paciência e dedicação prestadas a mim.

Ao meu Co-orientador, Philip Cooper, pelos seus ensinamentos, orientação e apoio prestado em algumas facetas de minha vida e por ter me ajudado a concluir este trabalho.

Aos meus queridos pais, Angel Oviedo e Bethy Vera, por serem pilares muito importantes em minha vida e pela educação, por me ajudarem sempre em tudo que eu precisei com muito carinho, e por me apoiar na finalização desse estudo.

Aos meus irmãos Angel, Ronny, Daniela, pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

À minha cunhada, Amparo e sobrinhos Nery, Laís, Arianna, Cristina pelo carinho.

À toda equipe do laboratório de alergia e acarologia composta pelos professores Carina Pinheiro e Professor Luís Pacheco, aos colegas queridos que me apoiaram sempre direta ou indiretamente: Marcia, Alana, Anita, Flávia, Emília, Mariesi, Marina, Samara, Camili, Carol, Talita, Sara, Leonardo Nascimento, Ricardo, Fabian, João, Leonardo Santiago, Ângelo, Gessivaldo, Eduardo e Filipe.

À toda equipe do Equador pelo apoio nos trabalhos realizados: Martha Chico, Carlos Sandoval, Marithza e em especial meu amigo querido Alejandro, que não mediu esforços para me ajudar, me compreender e me orientar.

À Professora Camila Figueiredo e a sua equipe pela contribuição e suporte neste trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM).

Ao corpo administrativo do PPGIM pela ajuda e carinho.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS/UFBA) e aos seus professores, por terem me possibilitado realizar o curso de mestrado em Imunologia e contribuído no meu aperfeiçoamento intelectual.

Ao Laboratório de Laboimuno por permitir-me utilizar seus equipamentos.

Às agências financiadoras, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoa de Nível Superior (Capes) e Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (Fapesb), pelo custeio de minha bolsa de estudos.

A toda minha família que torce por mim e aos meus colegas e amigos, que me ajudaram direta e indiretamente, que me apoiaram, auxiliaram, e que posso contar sempre: Anita Cristina, Lenaldo, Gabriela, Yadira, Antônio Galvão, Nancy Alcântara, Lívia, Kelly, Maria Bongues, Maria Pedra, Luciana, Elizabet.

RESUMO

No presente trabalho, abordamos um estudo sobre a toxocaríase, que é uma zoonose negligenciada causada por larvas de *Toxocara* spp. (*T. canis* e *T. cati*). A prevalência é maior em regiões tropicais e também entre populações de baixa renda. Estudos experimentais têm demonstrado a ocorrência de transmissão vertical. Em humanos, existem poucos dados publicados sobre a transmissão vertical de *Toxocara* spp. e sobre a cinética da infecção; além disso, a associação com atopia e asma tem gerado dados controversos. Dessa forma, um estudo de coorte representa o melhor modelo para estudar essas questões. **Objetivo:** Determinar a frequência da soropositividade da infecção por *Toxocara* spp. em mães grávidas, nos cordões umbilicais e em crianças, desde seu nascimento até 60 meses de idade. Investiga-se a possibilidade de transmissão vertical e a existência da associação dessa parasitose com asma e atopia em crianças de cinco anos, de um estudo do coorte feito em Quinindé-Ecuador. **Metodologia:** A população foi composta por 290 mães pareadas com seus cordões umbilicais e 290 crianças, de 7 a 60 meses de idade. Um questionário epidemiológico foi realizado em cada idade e as amostras de sangue foram coletadas nas diferentes idades. A asma foi determinada através de sibilo nos últimos 12 meses. A atopia foi determinada através de teste de punctura cutâneo com diferentes alérgenos. A soroprevalência de *Toxocara* spp. foi determinada mediante ELISA indireto para detectar IgG anti- *Toxocara* spp. e a análise da cronicidade da infecção foi feita pela detecção de IgG de avidéz, utilizando para ambos ensaios antígeno excretor-secretor da fase larval de *Toxocara canis*. O ponto de corte do ensaio obtido foi de DO de 0,273. **Resultados:** A soroprevalência em mulheres grávidas foi de 80,7% e do sangue de cordão umbilical 84,1%; nas crianças aos 7 meses foi de 0,0%; aos 13 meses, foi de 9,3%; aos 24 meses, de 48,4%; aos 36 meses, foi de 64,9%; e aos 60 meses, foi de 80,9 %; a infecção por *Toxocara* spp. em todos os grupos estudados foi crônica. A análise da incidência da soropositividade nas crianças por período do ano, houve maior incidência aos 2 anos de idade (36,2%). O índice de eosinofilia acima de 5% foi positivamente associado á soropositividade para *Toxocara* spp.; a prevalência de sibilo nas crianças de 60 meses foi de 19,1%; rinite foi de 17,4%; atopia a ácaro foi de 13,1; e atopia a qualquer alérgeno 21,2%. Não foi encontrada associação entre asma e a soropositividade para IgG anti-*Toxocara* spp. nas crianças. O único fator de risco associado à soropositividade para *Toxocara* spp. nas mães foi moradia em área rural. Enquanto que nas crianças, a soropositividade estava associada com presença de cães em domicílio (OR = 5,14; IC 95% 1,13 – 23,45); com sexo masculino (OR = 1,68; IC 95% = 0,98 – 2,88); e presença de gato em domicílio (OR = 2,22; IC 95 % = 1,27 – 3,90). A soropositividade para *Toxocara* spp. foi associada positivamente com os níveis elevados de eosinófilos. **Conclusão:** A soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. nas mães é alta e as crianças começam a se infectar cedo e vai aumentando com a idade. A infecção é crônica. A incidência maior foi aos dois anos de idade. Nas mães morar em zona rural foi fator de proteção para a soropositividade para *Toxocara* spp. O principal fator de risco de soropositividade para *Toxocara* spp. nas crianças do estudo foi a presença de cães e de gato em casa. Esses fatores foram encontrados nos primeiros anos de vida da criança, porém nas idades maiores não se encontrou esta associação. Provavelmente seja porque os anticorpos persistem nas outras idades ou ocorram reinfecção frequente.

Palavras-chave: Asma. Fatores de risco. Incidência. Soroprevalência. *Toxocara*

ABSTRACT

In the present work, we present a study on toxocariasis, which is a neglected zoonosis caused by *Toxocara* spp. larvae. The prevalence is higher in tropical regions and among low-income populations. Experimental studies have demonstrated the occurrence of vertical transmission. In humans, there are few published data on the vertical transmission of *Toxocara* spp. and on the kinetics of infection; In addition, the association with atopy and asthma has generated controversial data. Thus, a cohort study represents the best model for studying these issues. **Objective:** To determine the frequency of seropositivity of *Toxocara* spp. In pregnant mothers and children, from birth to 60 months of age. There is a possibility of vertical transmission and the existence of the association of this infection with asthma and atopy five years old in children of five years, from a cohort study made in Quinindé-Ecuador. **Methodology:** The population was composed of 290 mothers and 290 children, from 0 to 60 months of age. An epidemiological questionnaire was performed for the mothers and for each age period of the children; blood samples were collected at the different age groups. Asthma was determined by wheezing in the last 12 months. Atopy was determined by skin prick test with different allergens. The *Toxocara* spp. seroprevalence was determined by indirect ELISA. The chronicity of the infection was estimated by a IgG avidity ELISA, using excretory-secretory antigen of the larval phase of *Toxocara canis*. The assay cut-off was OD of 0.273. **Results:** The anti-*Toxocara* spp. IgG seroprevalence in pregnant women was 80.7%; in umbilical cord blood was 84.1%; at 7 month it was, zero %; at 13 months, it was 9.3%; at 24 months, it was 48.4%; at 36 months, it was 64.9%; and at 60 months, it was 80.9%. The *Toxocara* spp. infection all studied groups was chronic. There was a greater incidence at two years of 36, 2%. Eosinophil indices above 5% was associated with *Toxocara* spp seropositivity. The prevalence of wheezing among children aged 60 months was 19.1%; Rhinitis was 17.4%; Atopy to mite was 13.1; and atopy to any allergen was 21.2%. No association was found between asthma markers and *Toxocara* spp. seropositivity the risk factors associated with *Toxocara* spp. was presence of dogs and cats at home (OR = 2.22, 95% CI = 1.27-3.90). *Toxocara* seropositivity was positively associated with elevated levels of blood eosinophils. **Conclusion:** the seroprevalence of anti-*Toxocara* spp. IgG was high in the mothers and the children started to get infected early and it increased with age. The infection was chronic in all studied groups. The highest incidence of *Toxocara* spp. seropositivity was at two years of age, Mothers living in rural areas were protected against being seropositive. The main risk factor for the children in the study was the presence of dogs and cats at home. These factors were found in the first years of the child's life, in the older ages we did not find this association. It is probably because the antibodies persist in the other ages or there are recurrent infection.

Keywords: Asthma. Incidence. Risk factors. Seroprevalence. *Toxocara*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	5
Figura 2	Mapa da distribuição global da toxocaríase	8
Figuras do manuscrito # 1		
Figura 1	Mapa de Equador e localização do Município de Quinindé Esmeraldas, Equador	23
Figura 2	Soroprevância de anticorpos IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. mãe, soro de cordão umbilical e em crianças de 7 meses	28
Figura 3	Índice de Avidéz de IgG anti – <i>Toxocara</i> spp. em soros de mães e de cordões umbilicais	29
Figuras do manuscrito # 2		
Figura 1	Fluxograma da população de estudo	44
Figura 2	Obtenção do antígeno excretório/secretório de <i>T. canis</i>	47
Figura 3	Prevalência de anticorpos IgG anti- <i>Toxocara</i> spp., em soros de crianças 7 a 60 meses	50
Figura 4	Índice de avidéz de IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. em soro de crianças de 13 até 60 meses	51
Figura 5	Incidência de IgG anti - <i>Toxocara</i> spp., em crianças de 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela manuscrito #1

Tabela 1	Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. em 290 mães de Quinindé-Ecuador, 2005 - 2009	30
-----------------	---	----

Tabelas manuscrito #2

Tabela 1	Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. em crianças de 13, 24, meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador no período de 2009 e 2014	54
Tabela 2	Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. em crianças de 36 e 60 meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador no período de 2009 e 2014	56
Tabela 3	Associação da infecção por <i>Toxocara</i> spp. com eosinófilos em crianças de 13, 24, 36 e 60 meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador no período de 2009 e 2014.	57
Tabela 4	Associação da infecção por <i>Toxocara</i> spp. com marcadores Alérgicos em crianças de 5 anos de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CD25 - Grupamento de diferenciação de linfócito t regulatório

CD4 - Grupamento de diferenciação de linfócito t auxiliar

ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay

FcεRI - receptor da porção Fc de imunoglobulina E tipo I

FcεRII - Receptor da porção Fc de imunoglobulina E tipo ii

FcRn - Receptor Fc neonatal

IFN-γ - Interferon gama

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IL - Interleucina

ISAAC- Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância

LMV - Larva migrans visceral

MHC II - Complexo principal de histocompatibilidade classe 2

PEG - Polietilenoglicol

T. canis -*Toxocara canis*

T. cati - *Toxocara cati*

TES - Antígeno excretado-secretado da larva *Toxocara*

TGF-β - Fator β de transformação do crescimento tumoral

TH - Células T auxiliares (T helper)

TLR - receptores do tipo Toll

TPC - teste de puntura cutânea

TSLP- Linfopoetina estromal tímica

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Características do <i>Toxocara</i> e morfologia	3
2.2	Resposta imune do <i>Toxocara</i> spp.	6
2.3	Epidemiologia e fatores de risco para infecção por <i>Toxocara</i> spp.	8
2.4	Toxocaríase na gestação	10
2.5	Diagnóstico da toxocaríase	10
2.6	Doenças alérgicas	11
2.7	Modelos experimentais de infecção por <i>Toxocara</i> spp. e alergia	16
3.0	HIPÓTESE E OBJETIVOS	18
3.1	Hipóteses	18
3.2	Objetivos	18
3.3	Objetivos específicos	18
4.0	CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Soroprevalência de <i>Toxocara</i> spp. em mulheres grávidas, transmissão congênita da toxocaríase e fatores associados à infecção numa coorte de mães e crianças até os 7 meses de idade do município de Quinindé-Ecuador	19
4.1	Introdução	21
4.2	Material e métodos	22
4.3	Resultados	27
4.4	Discussão	31
4.5	Referências	36
5.0	CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Soroprevalência de toxocaríase em crianças de 7 a 60 meses de idade; e análise da cinética da soropositividade e associação com asma em Quinindé, Esmeraldas, Ecuador.	39
5.1	Introdução	41
5.2	Material e métodos	43

5.3 Resultados	49
5.4 Discussão	59
5.5 Referências	65
6.0 CONCLUSÃO GERAL	69
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1.0 INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose cosmopolita comum e negligenciada, mais frequente encontrada em países em desenvolvimento. Essa zoonose é causada por nematódeos intestinais do gênero *Toxocara*, helmintos que habitam o intestino delgado dos hospedeiros definitivos, como por exemplo, cães (*Toxocara canis*) e gatos (*Toxocara cati*) entre outros (RUBINSKY-ELEFANT *et al.*, 2010). Nos hospedeiros definitivos, existem três vias de transmissão: 1) por via transmamária; 2) por ingestão direta de ovos presentes no solo; e 3) por via transplacentária. Em canídeos as larvas destes parasitos podem permanecer em estado dormente nas fêmeas, sendo reativadas durante a gestação, migrando através da placenta e infectando os filhotes antes do nascimento (SCHNIEDER; LAABS; WELZ, 2011).

Os seres humanos são hospedeiros paratênicos, e se infectam pela ingestão acidental dos ovos embrionados de *Toxocara* spp., eliminados pelos hospedeiros definitivos no solo, contaminando o ambiente e os alimentos ou pelo contato com pelos de animais (CONG, WEI *et al.*, 2014; DUTRA *et al.*, 2013). O grande número de ovos excretados e a capacidade de resistir a condições ambientais favorável, como temperatura e umidade, podem influenciar nas altas prevalências reportadas em seres humanos (MANINI *et al.*, 2012). O parasito não se desenvolve completamente no ser humano e as larvas migram por órgãos e sistemas por meses, e até mesmo anos, causando reações inflamatórias sistêmicas ou locais de acordo com o local afetado (DESPOMMIER, 2003; ROLDÁN *et al.*, 2010). As principais manifestações clínicas são: Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Ocular (LMO), Meningoencefalite Eosinofílica (EME), neurotoxocaríase e toxocaríase oculta ou encoberta (infecção assintomática) (CHEN *et al.*, 2012; MACPHERSON, 2013). Apesar de a infecção vertical de *Toxocara* spp. ter sido descrita em animais experimentais (AVILA *et al.*, 2009), esta forma de transmissão não tem sido descrita, exceto por um caso reportado de toxocaríase ocular congênita em humanos (MAFFRAND *et al.*, 2006).

Estudos epidemiológicos mostram que a toxocaríase tem uma distribuição mundial, pode ser encontrada em países desenvolvidos e em desenvolvimento. E é mais prevalente em países com clima tropical e subtropical, tanto na população urbana quanto na rural. Pode afetar todas as idades e qualquer gênero, sendo mais prevalentes nas crianças menores de 10 anos. Isto se deve ao fato delas brincarem em áreas contaminadas pelos animais de estimação como cães e gatos, como por exemplo, em praças públicas, pela falta de higiene adequada e maior contato com animais parasitados. Alguns estudos sorológicos sobre prevalência de

Toxocara spp. em crianças mostraram taxas em torno de 50% (FIGUEIREDO, S. D. P *et al.*, 2005; MENDONÇA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016), enquanto em adultos a taxa de prevalência varia de 8,7% a 65,0 % (NEGRI *et al.*, 2013; ROLDÁN *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011). Os fatores de risco para a toxocaríase podem variar de acordo com a localidade do estudo, eficiência do controle da população canina e felina, condições socioeconômicas, idade e gênero do hospedeiro humano (OVERGAAUW; VAN KNAPEN, 2013; STRUBE; HEUER; JANECEK, 2013).

A infecção causada pelo *Toxocara* spp. pode se desenvolver de forma crônica e assintomática, sendo o teste de ELISA indireto o principal diagnóstico utilizado. Essa técnica não discrimina se uma infecção é recente ou tardia, mas tal limitação pode ser superada através da determinação de avides de anticorpos, sendo observado, em casos crônicos, uma alta avides de ligação da imunoglobulina G (IgG) ao antígeno, enquanto a baixa avides é observada em infecções agudas (DZIEMIAN *et al.*, 2008).

A relação entre helmintos, atopia e asma, é uma questão controversa, especialmente em ambientes tropicais, onde ambas as condições são comuns. As doenças compartilham os mecanismos de imunidade, tais como IgE e eosinófilos. Pesquisas vêm demonstrando que crianças infectadas com *Toxocara* apresentam elevados níveis de IgE específicos para o parasita e aeroalérgenos, com elevadas taxas de eosinofilia e hiperreatividade das vias aéreas, desencadeando sintomas clínicos de quadro de infecções respiratórias como asma, rinite alérgica e atopia (PINELLI, ELENA *et al.*, 2007).

Este trabalho teve os seguintes objetivos: investigar a prevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mães e crianças desde seu nascimento até os 5 anos; avaliar uma possível transmissão vertical; investigar a cinética de soropositividade para *Toxocara* spp. ao longo do tempo em um grupo de crianças e investigar possíveis associações da soropositividade por *Toxocara* spp. com marcadores de atopia e asma em uma população de Quinindé, Equador.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

Toxocaríase é uma doença parasitária causada pela infecção do hospedeiro por parasitos do gênero *Toxocara* (principalmente *T. canis*, cujo hospedeiro definitivo é o cão, e *T. cati*, parasito de gatos (CARVALHO; ROCHA, 2011). As infecções causadas por *T. canis* ocorrem com maior frequência se comparadas com o *T. cati*. Esse ascarídeo, em estado adulto, habita o intestino delgado do cão e do gato onde as fêmeas do parasito liberam grande quantidade de ovos, e que são eliminados com as fezes. A contaminação em humanos ocorre quando os ovos larvados são ingeridos acidentalmente. Sendo o homem um hospedeiro paratênico, o parasito não completa seu ciclo, e em sua forma larvária pode migrar por meses a anos por diversos órgãos e pelos sistemas, ocasionando reações inflamatórias locais e sistêmicas (DESPOMMIER, 2003; STRUBE; HEUER; JANECEK, 2013)

2.1 Características do *Toxocara* spp. e morfologia

O gênero *Toxocara* pertence à classe Nematoda, família Ascarididae e é composto por mais de 30; as duas espécies mais comuns e prevalentes, são o *T. canis* e *T. cati* (HUAPAYA H *et al.*, 2009; NOH *et al.*, 2012). O desenvolvimento do parasito completa no intestino delgado do hospedeiro definitivo e se apresenta nas seguintes formas evolutivas: ovos não embrionados, ovos embrionados, larvas no primeiro, segundo, terceiro, e quarto estágios; além de vermes adultos, macho e fêmea. O verme adulto macho mede de 4 cm a 10 cm de comprimento e o verme fêmea de 6 cm a 18 cm. A fêmea sobrevive de quatro a cinco meses aproximadamente, fazendo a postura de 25 mil a 200 mil ovos por dia, que são eliminados nas fezes de cães e gatos infectados (STRUBE; HEUER; JANECEK, 2013).

O ovo é eliminado sob a forma não embrionada. O período de embrionamento é de quatro a seis semanas aproximadamente, em ambiente adequado (qualidade do solo, temperatura e umidade da terra), tornando-se infectantes (BERROCAL, 1980; KROTEN *et al.*, 2016).

2.1.1 Ciclo de vida do *Toxocara canis* nos animais

O ciclo de vida desse parasito nos cães se apresenta da seguinte forma: os ovos embrionados contendo a larva em estágio L3 que se encontram no ambiente são ingeridos por hospedeiros definitivos. Quando os ovos ingressam ao intestino, eclodem e liberam as larvas, as quais penetram na mucosa do intestino delgado. Elas entram na circulação sanguínea e vão migrando por diferentes órgãos como pulmão, onde ocorre a mudança da fase L3 para a L4. A L4 é deglutida e volta ao intestino no qual se transforma em verme adulto. Após a cópula, a fêmea elimina os ovos que são excretados pelas fezes e contaminam o ambiente.

Outra forma comum de transmissão entre canídeos, são pelas larvas que ficaram encistadas nos tecidos e que são reativadas pelos hormônios da gravidez no último trimestre da prenhez das cadelas, que infectam as suas crias através da placenta. As larvas migram também para as glândulas mamárias pela corrente sanguínea e os cães recém-nascidos ao amamentar podem se infectar pelo leite da mãe com larvas no estágio L3 (LEE, A. C. Y. *et al.*, 2010).

2.1.2 Ciclo de vida do parasito no homem

O ser humano ingere de forma acidental os ovos embrionados presentes no solo e em águas contaminadas, sendo um hospedeiro paratênico. A contaminação ocorre, porém, com menor frequência em alimentos contaminados com ovos embrionados ou pela ingestão de larvas contidas em carnes malcozidas de outros hospedeiros intermediários (como o coelho, porco ou frango) (CHOI *et al.*, 2012).

O ciclo biológico do parasito não se completa, isso acontece porque, no ser humano, não é capaz de chegar até a fase de verme adulto. Quando o ser humano ingerem os ovos embrionados, o pH ácido do estômago mais o pH alcalino do duodeno promove a eclosão dos ovos e liberação das larvas no intestino delgado, que migram para o fígado e pulmões, mas não alcançam o intestino e não chegam à etapa adulta. Ao invés disso, as larvas migram através do corpo, e vão invadindo vários órgãos e sistemas, tais como fígado, pulmões, olhos e cérebro, embora, após a infecção, parte das larvas acabem morrendo. Dependendo do órgão afetado, as larvas podem permanecer encapsuladas em estado latente, sobrevivendo meses ou anos, ou pelo o resto da vida, ocasionando reações inflamatórias associadas com eosinofilia,

hemorragia, necroses, e formação de granulomas (ARCHELLI; KOZUBSKY, 2008; BERROCAL, 1980).

A maioria das pessoas infectadas são assintomáticas, entretanto a infecção pode levar à enfermidade denominada Larva Migrans Visceral (VLM), sendo essa doença mais frequente em crianças menores de cinco anos. Reconhecem-se geralmente quatro tipos de síndromes associadas à infecção pelo *Toxocara* spp. que afeta o homem: Síndrome de Larva Migrans Visceral (SLV), Síndrome de Larva Migrans Ocular (SLO), a neurotoxocaríase e a toxocaríase assintomática (FINSTERER; AUER, 2013; PAUL *et al.*, 2009).

Figura 1. Ciclo de vida de *T. canis* nos hospedeiros definitivos e hospedeiros paratênicos.

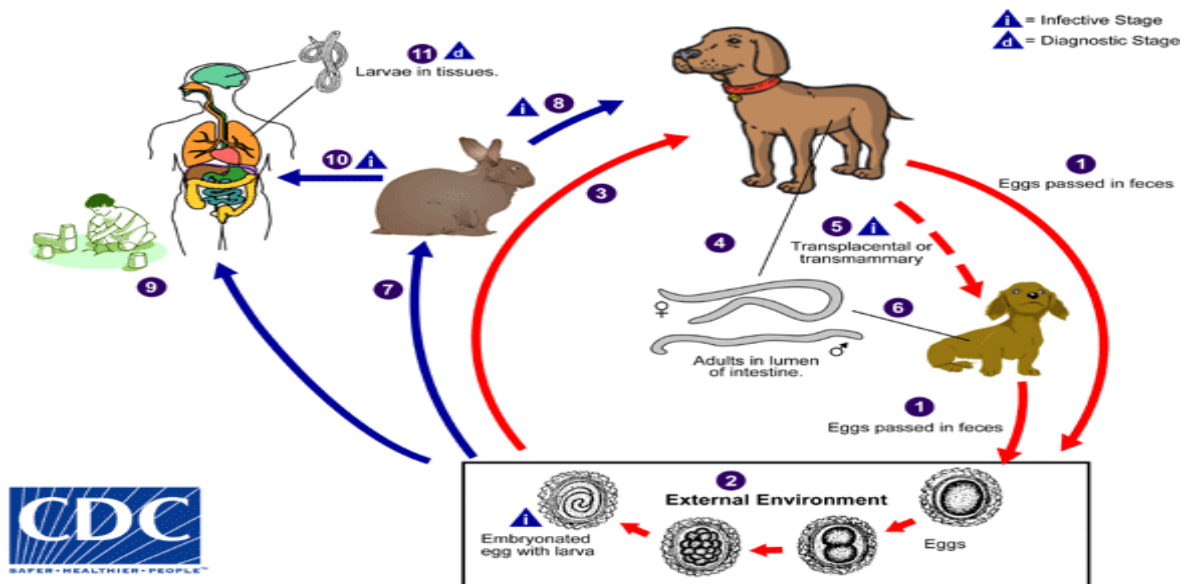


Figura 1 – Ciclo de vida de *T. canis*: O *Toxocara canis* completa o seu ciclo de vida nos cães, os seres humanos são hospedeiros acidentais. 1) Ovos não embrionados são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo; 2) Estes tornam-se embrionados e infectantes no ambiente; 3) Segue a ingestão dos ovos por outros cães; 4) Os ovos embrionados, eclodem no intestino e penetram pelo epitélio intestinal do animal; 5) Estágios encistados são reativados em cadelas durante a fase final da gestação e infectam os filhotes por via transplacentária ou mamária; 6) Os filhotes são a maior fonte de contaminação ambiental por ovos de *Toxocara canis*; 7) A infecção também pode ocorrer devido a ingestão de carne de outros hospedeiros paratênicos, como pequenos mamíferos (ex: coelho) infectados com ovos de *T. canis* e os ovos eclodem liberando as larvas que atravessam a parede intestinal e migram para diversos tecidos, onde serão encistados.; 8) O ciclo torna-se completo quando os cães, ingerem esses hospedeiros acidentais, se infectam e desenvolvem os vermes adultos que passam a fazer oviposição no intestino.;9) Os humanos são hospedeiros acidentais, que podem se infectar através da ingestão de ovos infectantes presente no solo, ou através da ingestão de carne de outro mamífero infectado.;10) Depois da ingestão, os ovos eclodem e as larvas penetram na parede intestinal e alcançam a circulação migrando para uma variedade de tecidos (fígado, coração, pulmão, cérebro, olhos); 11) As larvas podem causar reações inflamatórias graves nos sítios de infecção. As duas principais manifestações da toxocaríase humana são a larva migrans visceral e a larva migrans ocular. O diagnóstico é realizado através da sorologia ou por identificação das larvas em biópsia ou autópsia. **Fonte: CDC (Centers for Disease Control and Prevention)**

2.1.3 Antígenos de *Toxocara canis* excretados e secretados pelas larvas (Ag TES)

Durante o processo de migração pelos tecidos, as larvas de *Toxocara canis* em estágio 3 permanecem metabolicamente ativas excretando e secretando produtos antigênicos (Ag TES), causando inflamação nos tecidos e reações alérgicas. A produção do Ag TES experimentalmente foi demonstrado inicialmente por DE SAVIGNY e colaboradores (DE SAVIGNY, 1975).

Os antígenos excretórios e secretórios (TES) são compostos por uma mistura de moléculas antigênicas glicosiladas complexas, tal como mucinas (MUC) e lectinas (CTL), que interagem com o sistema imune do hospedeiro. As larvas eliminam a cutícula rica em mucinas quando elas têm contato com o anticorpo e com as células que atuam na defesa do hospedeiro. Essas moléculas são reconhecidas como estranhas no corpo do ser humano e são capazes de desencadear uma resposta imune (MAIZELS, 2013).

2.2 Resposta imune ao *Toxocara* spp.

A resposta imune desencadeada pelo contato do *Toxocara* spp. com o hospedeiro varia de acordo com os órgãos e tecidos afetados. Nos pulmões, a resposta inflamatória é constante por vários meses; já em tecidos como cérebro e músculos, a resposta é menor, onde as larvas podem ficar em estado de hipobiose. Na fase inicial da infecção ocorre uma resposta imunológica inata, caracterizada por alto nível de eosinófilos, e um aumento específico no número de neutrófilos, basófilos e monócitos no sangue (CAMILLO *et al.*, 2014). Quando as larvas de *Toxocara* infectam o hospedeiro, elas são atacadas por células polimorfonucleares como eosinófilos, neutrófilos, basófilos e macrófagos (NAGY *et al.*, 2012).

A larva de *T. canis* tem como característica sobreviver por longos períodos e continuar a migração pelos tecidos. Isso acontece porque a larva contém uma capa externa rica em glicoproteínas chamada cutícula. Essa cutícula vai ser trocada periodicamente, liberando moléculas na circulação sanguínea, com capacidade imunomodulatórias, que promovem a evasão da resposta imune, dificultando as respostas celular e humoral do hospedeiro por alteração da variação antigênica, proporcionando um ambiente propício para o parasito sobreviver por longos períodos (LOUKAS *et al.*, 2000; PAGE *et al.*, 1992).

Pesquisas mostram que em modelos animais os antígenos excretórios e secretórios do *Toxocara* spp. estimulam uma resposta adaptativa de tipo Th2; também existe um aumento de

IFN- γ circulante no plasma o que é característico de resposta Th1. O IFN- γ reage com células B, T, NK e macrófagos, e é um mediador chave das respostas imunes mediadas por células (PECINALI *et al.*, 2005), e ocasionam aumento dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Os antígenos TES recrutam macrófagos alternativamente ativados e eosinófilos, e promove o desenvolvimento da resposta imunológica de tipo Th2 modificada com aumento das citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (MAIZELS, 2013).

O aumento de IL-4 vai estimular a proliferação e desenvolvimento das células B, com a troca de isotipo de IgM para IgE e produção de anticorpos específicos IgG anti-*Toxocara* spp. e anticorpos inespecíficos (CARVALHO; ROCHA, 2011). O aumento da IL-4 também contribui para a estimulação de mastócitos, o que aumenta a resposta inflamatória quando eles se degranulam. De maneira semelhante, esse aumento induz os macrófagos a produzirem IL-1 o que também vai estimular células B e uma resposta Th2.

Adicionalmente, o aumento de IL-5 estimula a produção de eosinófilos, aumentando sua quantidade tanto nos tecidos como na corrente sanguínea. Quando a larva de *T. canis* persiste por longos períodos nos tecidos, ela vai amplificar o processo inflamatório, na tentativa de combater a infecção com a produção de citocinas tais como IFN- γ IL-13, IL-5, IL-6, podendo levar a formação de granulomas eosinofílicos. (NAGY *et al.*, 2012).

Quando os processos pró-inflamatórios são ativados, em contrapartida, o processo de regulação também é ativado, ocorrendo proliferação de células T regulatórias (Treg) que tentam manter a homeostase através também da produção de IL-10 (ARANZAMENDI; SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC; PINELLI, 2013; TORINA *et al.*, 2005).

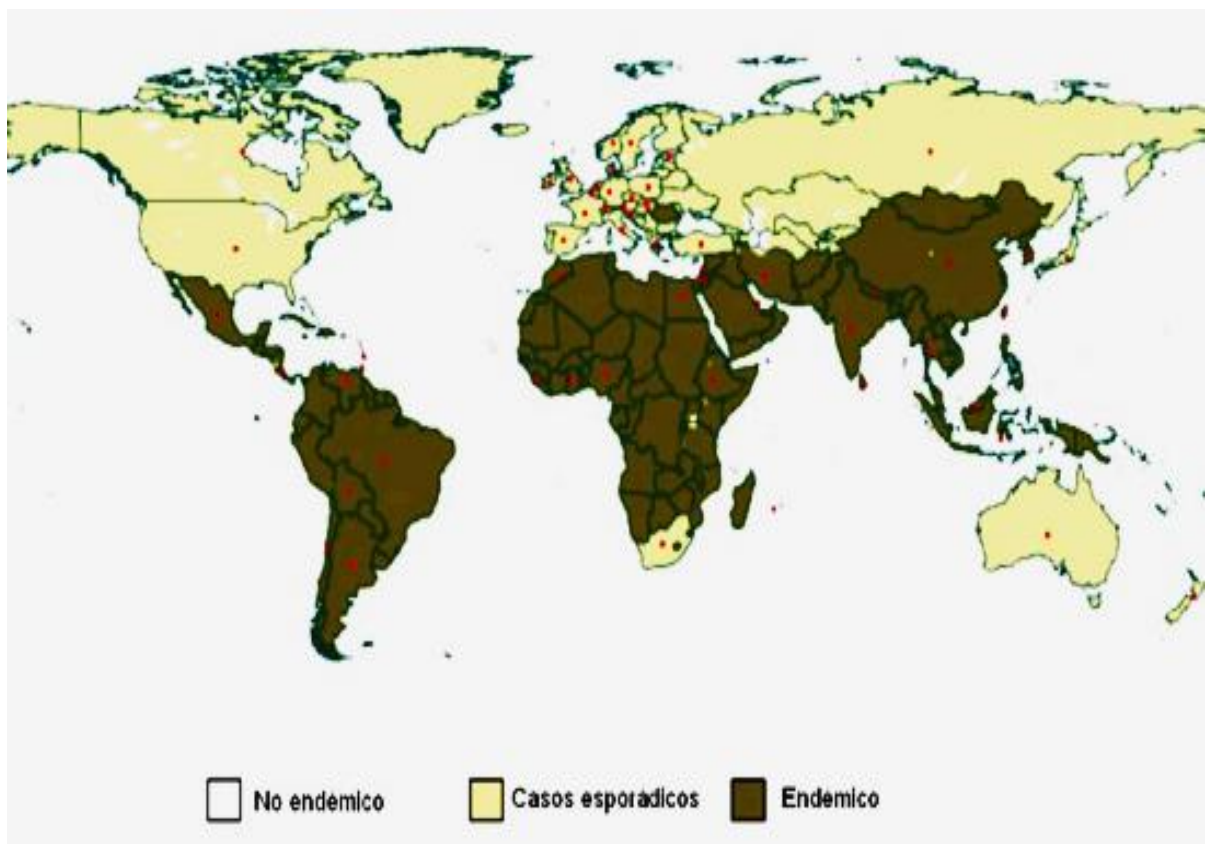
A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória imunossupressora que tem a função de inibir a formação de granulomas contra o parasito. Esta citocina regula a inflamação e a fibrose evitando a formação de fibrose eosinofílica; isso acontece porque a IL-10 atua diretamente no fibroblasto diminuindo a produção de colágeno. Esse mecanismo de controle evita a resposta imune exacerbada quando o *Toxocara* está circulando pelo organismo (NAGY *et al.*, 2012).

2.3 Epidemiologia e fatores de risco para infecção por *Toxocara* spp.

Toxocaríase é uma zoonose cosmopolita e ocorre com maior frequência em países de regiões tropicais e subtropicais da América, África e Ásia (Figura 2), que são considerados

países endêmicos, dada uma estreita interação entre o homem, com os animais de estimação, tal como os cães e gatos (DESPOMMIER, 2003).

Figura 2 – Distribuição global da toxocaríase – Regiões de clima quente e temperado são as mais prevalentes, como os continentes América Latina, África e Ásia.



Fonte: (Delgado, 2009)

Os níveis de soroprevalência de *Toxocara canis* são maiores em países de regiões tropicais e entre populações de baixa renda e higiene escassos (MANINI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011). Essa doença afeta todas as idades e ambos sexos, sendo mais prevalentes em crianças na idade escolar (MENDONÇA *et al.*, 2013).

A idade é um fator de risco importante. Em um estudo com crianças de 5 a 7 anos de idade no estado de Harnett, Carolina do Norte, EUA, a prevalência foi de 23,1%, sendo mais comum nas zonas rurais (WORLEY *et al.*, 1984). Outros fatores de risco que estão

associados à soroprevalência de *Toxocara* spp. são baixa renda, local de moradia (zona rural ou urbana) e o sexo masculino (ESPINOZA *et al.*, 2010).

Estudos epidemiológicos reportam que a soropositividade para o *Toxocara* spp. varia de acordo com as características socioeconômicas de cada país e a região na qual moram, encontrando-se prevalências de 2,4% na Dinamarca (STENSVOLD *et al.*, 2009); 8,5% em zonas urbanas e 4,6% em zonas rurais da Espanha (GARCÍA, 1989); 1,6% na Itália, na região de Marcas, em áreas urbanas e rurais (HABLUETZEL *et al.*, 2003); 83% no Caribe (THOMPSON *et al.*, 1986); e 86,75% na Micronésia, República das Ilhas Marshall (Taiwán) (FU *et al.*, 2014).

Os países de América Latina demonstram uma prevalência muito heterogênea, variando desde 20% até 78%. No Peru, em dois estudos diferentes realizados em zona urbana e rural, a prevalência variou de 20,46% (área urbana) a 35,66% (área rural) (ESPINOZA *et al.*, 2010). No Paraguai, um estudo feito em uma zona rural com crianças menores de 15 anos encontrou-se uma prevalência de 78% (RIVAROLA *et al.*, 2009). Na Venezuela, em uma comunidade indígena, foi relatado 21,7% de soropositividade para *Toxocara* spp. (DÍAZ-SUÁREZ *et al.*, 2010). Em Cuba, num estudo com crianças, a prevalência foi de 38,8% (SARIEGO *et al.*, 2012). No México, em crianças de 2 a 16 anos, a prevalência encontrada foi de 22,2% (ROMERO NÚÑEZ *et al.*, 2013). No Equador, há poucos estudos sobre a prevalência de *Toxocara* spp., entretanto, um estudo feito com 180 crianças de idade de 5 a 10 anos, em um hospital em Quito, a prevalência foi de 30% (TORRES; LOPEZ, 2004).

No Brasil existe também diversidade de prevalência: em Capela do Socorro, São Paulo, em crianças menores de 14 anos, a prevalência foi de 54,8% (FIGUEIREDO, S. *et al.*, 2005). Em um estudo transversal, com 34 famílias, feito no estado do Amazonas, a prevalência foi de 52% (DAMIAN *et al.*, 2007). Em uma zona rural de São Paulo, a prevalência foi de 21,5% (PRESTES-CARNEIRO *et al.*, 2008). Também no Paraná, a prevalência foi de 32,22% (CARVALHO; ROCHA, 2011). Em regiões periféricas de Salvador, e em três bairros diferentes de estudo foi encontrado 48,4%, 46 % e 65 % (MENDONÇA *et al.*, 2013); (DATTOLI *et al.*, 2011); (SOUZA *et al.*, 2011), respectivamente. Na região metropolitana de Salvador, em áreas semirural e urbana foi encontrada uma prevalência de 63,6% (SILVA *et al.*, 2016).

2.4 Toxocaríase na gestação

O *Toxocara* spp. pode afetar todas as idades. Pesquisas indicam que outro grupo afetado pela infecção do *Toxocara* spp. é o das gestantes. Existem poucos estudos sobre a ocorrência do *Toxocara* spp. na gravidez, e a sua transmissão vertical. Mulheres gestantes infectadas pelo *Toxocara* spp. podem ter alterações tanto na saúde reprodutiva quanto no desenvolvimento imunológico da criança. Existem poucos estudos relatados e a prevalência de soropositividade em gestantes variando de 6,43% (SANTOS *et al.*, 2015) a 33 % (TAYLOR *et al.*, 1996).

Estudos experimentais com modelos animais têm relatado a ocorrência de transmissão vertical de larvas e anticorpos IgG anti-*Toxocara*, sendo mais frequente em infecção aguda, mas também com menos frequência em infecção crônica. Lee e colaboradores utilizando modelos experimentais com toxocaríase aguda demonstraram a ocorrência de infecção congênita, encontrando larvas deste parasita no útero, placenta, fetos de camundongos (LEE, K. T, 2015). Por outro lado, em um estudo feito em camundongos BALB/c fêmeas e suas proles durante infecção crônica, encontrou anticorpos IgG anti-*Toxocara* em suas proles, confirmando a transmissão vertical das larvas (SCHOENARDIE, E. *et al.*, 2014).

O primeiro relato da infecção congênita em humanos foi feito na Argentina (MAFFRAND *et al.*, 2006). Nesse relato, foi diagnosticado retinopatia em um recém-nascido prematuro, onde foi detectada uma imagem compatível com larva de *Toxocara* no exame de fundo de olho. Além disso, foi detectado eosinofilia alta e a presença de anticorpos IgG foi negativa para o neonato e positiva para a mãe. Existem indícios da possibilidade da passagem de larvas do *Toxocara* spp. através da placenta, porém são necessários mais estudos para determinar qual o impacto da infecção humana na vida reprodutiva.

2.5 Diagnósticos da toxocaríase

Como relatado anteriormente, o homem é um hospedeiro paratêmico para o *Toxocara*, por esse motivo o diagnóstico da infecção não pode ser realizado pelo parasitológico de fezes, pois estes hospedeiros não eliminam ovos nas fezes. O diagnóstico utilizado com maior frequência é através da detecção de anticorpos no soro pela técnica sorológica de ELISA indireta, utilizando como antígenos, produtos excretados/secretados pela larva L3 cultivada

em meio de cultura. Estes produtos antigênicos são originados dos órgãos secretores do parasito, da glândula esofágica e do poro secretor (ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.*, 2008; DE SAVIGNY; TIZARD, 1977). A técnica tem uma alta sensibilidade e especificidade.

Apesar do parasito utilizado para a obtenção do fator excretado ser o *T. canis*, esse ensaio não é capaz de discernir as infecções por este parasito ou pelo *T. cati*. (ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.*, 2008). Além disso, o *Toxocara canis* reage cruzadamente com vários helmintos, e pelo fato de outras helmintíases serem prevalente em países subdesenvolvidos, é recomendado evitar a reatividade cruzada absorvendo os soros da população de estudo com extrato bruto de *Ascaris lumbricoides*, melhorando a especificidade do ELISA (KENNEDY *et al.*, 1987).

2.6 Doenças alérgicas

Manifestações alérgicas são altamente prevalentes em muitas partes do mundo. Estima-se que mais de 20% da população mundial sofre de doenças alérgicas (WHO, 2002), sendo a alergia uma reação de hipersensibilidade imediata desencadeada por mecanismos imunológicos específicos. Estas condições são resultados da geração de uma resposta Th2 induzidos por antígenos ambientais diversos e produção de anticorpos de tipo IgE (CORREA, J.; ZULIANI, 2001).

A atopia é uma predisposição genética, caracterizada pela produção de altos níveis de anticorpos IgE, em resposta a vários antígenos (que são inócuos para indivíduos não atópicos). O indivíduo atópico desenvolve reações de hipersensibilidade imediata a alérgenos como o pólen, alimentos, ácaros da poeira e outros (JOHANSSON *et al.*, 2004).

A asma é uma doença crônica, cosmopolita e estima-se que cerca de 334 milhões de pessoas são afetadas por essa doença, sendo mais prevalente em crianças, de países industrializados e em áreas urbanas (GLOBAL ASTHMA NETWORK, 2014). Apesar de a asma ter uma etiologia complexa, grande parte dos casos são secundários a hipersensibilidade Tipo I provocada por exposição aos alérgenos e ocorre associado a outros quadros alérgicos como eczema e rinite (marcha atópica) (MASOLI *et al.*, 2004). A hipersensibilidade Tipo I é caracterizada por uma resposta imune de Tipo Th2 com alta produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 que estimulam a produção de IgE, de eosinófilos e de muco culminando com a

modificação do epitélio pulmonar, que passa a ser caracterizado por uma alta proliferação de fibroblastos, miofibroblastos, ocasionando fibrogênese e formação de cicatriz. Clinicamente o remodelamento brônquico provoca hiperresponsividade das vias aéreas, sibilância, tosse e apneia que ocorrem episodicamente (WEISS; BOSTON, 2000).

Nas três últimas décadas, as doenças alérgicas, incluindo a asma, aumentaram em proporções epidêmicas e expandiram em países ocidentais desenvolvidos como Reino Unido, Austrália, Nova Zelândia e República da Irlanda para países em desenvolvimento da África, América Latina e partes da Ásia (ASHER *et al.*, 1995; PEARCE, N *et al.*, 2007).

A prevalência de asma em todo o mundo é variada de 0,8% na China e 2,4% na Índia, até 32,6% na Nova Zelândia e 37,6% na Costa Rica em crianças de 13 a 14 anos (LAI *et al.*, 2009). Houve um incremento de asma na América Latina, principalmente nas zonas urbanas e periféricas (BARRETO, M. L. *et al.*, 2010; PATEL; JÄRVELIN; LITTLE, 2008). Estes aumentos de prevalência da asma e das demais doenças alérgicas podem ser explicadas pela hipótese da higiene formulada nos anos 1989 por Strachan, o qual propôs que crianças expostas a infecções por diferentes patógenos como bactérias, vírus, helmintos criam proteção contra alergia (Strachan, 1989). Maior higiene, uso exagerado de antibióticos, vacinação, diminuição de uso de lactobacilos não permite uma maturação do sistema imunológico do indivíduo, logo uma resposta exacerbada Th2 a estímulos inócuos se destaca (UMETSU *et al.*, 2002; WOLD, 1998).

Estudos mostram que as infecções provocadas por helmintos podem também proteger contra doenças alérgicas; apesar desses patógenos induzirem aumento predominante de linfócitos Th2 na fase aguda, na fase crônica da infecção ocorre uma resposta Th2 modificada que cursa com um perfil de resposta regulatória, com aumento de células T regulatórias produtoras de IL-10 (SMITS *et al.*, 2010; YAZDANBAKHSI; MATRICARDI, 2002).

No entanto os relatos das infecções causadas por *Ascaris lumbricoides* e por *Toxocara* spp., são contraditórios e parece não proteger contra as alergias (ZHU *et al.*, 2015). Entretanto, os relatos de nosso grupo mostraram que a infecção por *A. lumbricoides* (ALCANTARA-NEVES *et al.*, 2012) e soropositividade para IgG anti-*Toxocara* spp. (MENDONÇA *et al.*, 2012) estavam associados com diminuição da reatividade cutânea, mas não se associavam com asma atópica e não atópica. Além disso, encontramos associação positiva de soropositividade para *Toxocara* spp. com IgE alérgeno específica (MENDONÇA *et al.*, 2012).

2.6.1 Asma e resposta imune mediada pela IgE

As reações alérgicas que são mediadas por IgE, são iniciadas quando o indivíduo é exposto a um alérgeno como poeira, pólen, pelos de animais, dentre outros. A sensibilização ocorre quando um antígeno entra em contato com células apresentadoras do antígeno (APCs), como as células dendríticas (CDs); elas fagocitam o alérgeno, que é fragmentado e apresentado aos linfócitos TCD4+ *naive* via MHC de classe II, induzindo a diferenciação destes para o perfil Th2. A ativação das células Th2 por alérgenos induz à produção e secreção de citocinas Th2 como IL-4, IL-13 e IL-5. A IL4 é uma citocina principal na resposta alérgica e atua na troca de isotipo de células B, e ajudam o linfócito B a diferenciar-se em plasmócitos, que irão produzir anticorpos IgE, que se liga aos seus receptores de alta afinidade (FcERI) e baixa afinidade (FcERII) presentes nos mastócitos, basófilos e eosinófilos e linfócitos B. Em uma segunda exposição ao antígeno os mastócitos são ativados através da ligação cruzada de duas moléculas de IgE com o alérgeno; após ativação estas células liberam grânulos contendo moléculas com atividade inflamatória (histamina, leucotrienos, prostaglandinas e citocinas) que induzem uma resposta de hipersensibilidade Tipo I em indivíduos atópico. Essas reações imunológicas culminam com sintomas clínicos que podem afetar diversos órgãos: como a pele, ocasionando urticária, angioedema e eczema; trato gastrointestinal causando náusea, vômito e dor abdominal junto com diarreia; trato respiratório ocasionando rinite, tosse e sibilância; além de reações sistêmicas podendo levar ao êxito letal, devido a hipotensão, conhecido como anafilaxia (CORREA, J.; ZULIANI, 2001).

Apesar de a literatura abordar a resposta Th2 como principal componente da asma alérgica, nem toda asma é atribuída a atopia. Estudos relatam que esta condição não chega a ser responsável nem por 50% de toda a prevalência de asma (PEARCE, N *et al.*, 2007; PEARCE, NEIL; PEKKANEN; BEASLEY, 1999; SOUZA DA CUNHA *et al.*, 2010). Os fatores de risco para esses dois fenótipos de asma podem divergir (BARRETO *et al.*, 2010). As formas não alérgicas da asma são desencadeadas por fatores ambientais tais como, poluentes do ar, vírus, estresse e obesidade (WENZEL, 2012).

Estudos sobre a heterogenicidade da resposta asmática ainda são incipientes e não deixam claro se todos os mecanismos relatados na asma ocorrem de forma associada ou dissociadas. Atualmente já se sabe que os componentes Th1 e Th17 também são encontrados na asma. O infiltrado neutrofílico é encontrado no epitélio de pacientes asmáticos e está

associado com uma maior gravidade de asma e resistência ao uso de corticóides (HOSOKI *et al.*, 2015; SUBRATA *et al.*, 2009). Em crianças e adolescentes das regiões periféricas de Salvador os pacientes asmáticos apresentavam elevada produção de IFN- γ (FIGUEIREDO, C. A. *et al.*, 2012). Os mecanismos envolvidos na asma não alérgicos são heterogêneos, a linfoproteína tímica estromal (TSLP) representa uma importante função na asma, ela é liberada por células epiteliais em resposta a diversos mecanismos danosos, a ativação dessa proteína leva a maturação de células dendríticas e apresentação de antígenos a células T, além de aumentar o recrutamento de células NKT, que associado a uma maior gravidade de asma (NAGATA *et al.*, 2007; SUBRATA *et al.*, 2009). As células linfoides inatas (ILcs) têm sido descritas atualmente nos estudos da fisiopatologia da asma. Estas células são subdivididas em ILc1s, ILc2s e ILc3s; as ILc1s são produtoras de IFN- γ e TNF- α , enquanto as ILc2s são produtoras de IL-5 e IL-13 e as ILc3s produtoras de IL-17 e IL-22. Elas não possuem uma característica fenotípica clara, entretanto foram identificadas através dos marcadores de linhagem c-kit. As células NK pertencem a família das ILc1s estão associadas com infiltrado eosinofílico e inflamação nas vias aéreas de pacientes asmáticos (WOO *et al.*, 2014). As ILcs2 são a maior fonte de citocinas Th2 na imunidade inata e são ativadas pelas citocinas TSLP (IL-7), IL-25 e IL-33. Enquanto a ILc1s e ILc2s parecem ter um papel importante na asma alérgica as ILc3s foram identificadas como envolvidas na asma associada com obesidade (WOO *et al.*, 2014).

2.6.2 Helmintos e asma

Como mencionado anteriormente, a asma é mais prevalente em países industrializados, e em menor prevalência em países em desenvolvimento. As infecções por helmintos têm uma distribuição geográfica inversa, sendo mais presentes nos países em desenvolvimento. Desta forma, eles podem ser em parte responsáveis por suprimir ou inibir o desenvolvimento da asma (COOPER, 2009).

Estudos têm demonstrado o papel imunorregulatório de antígenos de helmintos, em geral, melhorando as condições pró-inflamatórias, levando à redução do risco de ter alergias (MAIZELS, 2005). Dentre eles, podemos citar o *Schistosoma mansoni* (AMU *et al.*, 2010), o *Trichuris trichiura* e o *Ascaris lumbricoides* (GEIGER *et al.*, 2002).

As infecções helmínticas que estimulam células Th2, também possuem um papel protetor, reduzindo o risco de alergia, e levaram a uma reformulação da hipótese da higiene ressaltando o papel de células T regulatórias na modulação das respostas inflamatórias, tanto no perfil Th1 como no perfil Th2 (ALCANTARA-NEVES *et al.*, 2012).

Além da proteção por infecções helmínticas sobre as doenças alérgicas, nos países desenvolvidos, observou-se que viver em ambientes rurais também é um fator de proteção para estas doenças, isto se deve às exposições as atividades agrícolas de granjas rurais; ao contato direto com o arar a terra em ambiente rodeado de animais; beber leite de vaca fresco, ajuda nessa proteção. Em países em desenvolvimento, acontece o mesmo, porém, além desses fatores ambientais, também se atribui uma proteção maior quando ocorrem infecções parasitárias helmínticas crônicas na primeira infância ou durante da gravidez das mães das crianças (COOPER, 2009; VON MUTIUS, 2010).

Diferentes pesquisas têm demonstrado que infecções helmínticas persistentes, reinfecções e elevada carga parasitária, elevam a produção de citocinas regulatórias, como a IL10. A persistência dessas infecções faz com que haja proteção contra doenças alérgicas e asma, e isto porque existe uma estimulação de regulação anti-inflamatória, por causa dos desafios imunes persistentes, o que pode explicar a relação inversa de muitas infecções com doenças alérgicas (SMITS *et al.*, 2010).

Temos outros exemplos de infecções provocadas por helmintos zoonóticos. Nos hospedeiros humanos, eles têm a característica de não se desenvolver até a fase adulta, e as larvas ficam migrando por longos períodos nos tecidos. Essas infecções causam sintomas que mimetizam a asma, quando as larvas migram pelos pulmões, o sistema imune produz uma reação inflamatória que as destroem. Durante essas infecções, parece haver uma falha na regulação imunológica, provavelmente isto se deve ao fato do hospedeiro acidental e o parasito não evoluírem conjuntamente; temos como exemplos de infecções causadas por *Toxocara* spp., *Ascaris suum* e *Anquilostomas* conhecidas como síndrome de Loffler, que mimetiza clinicamente a asma (HEUKELBACH; FELDMEIERS, 2008).

2.7 Modelos experimentais de infecção por *T. canis* e asma

Nos modelos experimentais, as larvas de *T. canis* migram para diferentes tecidos, incluindo os pulmões. As larvas induzem uma resposta imunitária do tipo Th2 nos pulmões, em conjunto com um aumento de eosinófilos, macrófagos, linfócitos e IgE.

Em um estudo feito por Buijs e colaboradores, foi demonstrado que no modelo experimental com camundongo BALB/c, a infecção por *T. canis* causou alguns fenômenos como eosinofilia, níveis altos de IgE e edema, e isso também pode ser observado na asma alérgica. (BUIJS; LOKHORST; *et al.*, 1994). Por outro lado, Pinelli e colaboradores observaram, que em ratos BALB/c, tanto na infecção por *T. canis* como no tratamento com OVA, tinham alterações histológicas semelhantes, como por exemplo aumento da produção de IgE. Os camundongos BALB/c seria a estirpe mais apropriada para investigar os mecanismos envolvidos entre a infecção por *T. canis* e a asma (PINELLI, E *et al.*, 2001).

2.7.1 Infecção por *Toxocara* spp. e alergia

Estudos epidemiológicos têm mostrado resultados controversos sobre soropositividade para *Toxocara* spp. e manifestações alérgicas incluindo asma, piorando os sintomas e outros estudos não encontram essa relação (FERNANDO *et al.*, 2009). Talvez a razão dessa contradição seja devida alguns fatores como: diferentes desenhos de estudo, tipos de ensaio sorológico, diferentes critérios para determinar a soropositividade, idade e gênero.

Em um estudo feito na Holanda, com crianças de 4 a 6 anos, a infecção pelo *Toxocara* spp. se associou com manifestações alérgicas, levando um aumento da produção de imunoglobulina IgE específica contra alérgenos (BUIJS; BORSBOOM; *et al.*, 1994). Um estudo caso-controle feito na Malásia também encontrou uma possível associação entre o desenvolvimento da asma na infância e exposição ao *Toxocara* (CHAN *et al.*, 2001). A infecção por *T. canis* foi encontrada associada positivamente (OR 2,39 95% CI 1,17-4,85) a sintomas da asma em um estudo feito na Amazônia no Brasil, onde a exposição a *Toxocara* é muito comum (FERREIRA *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas em amostras provenientes de um banco de doadores de sangue em Salvador encontrou uma associação positiva significativa entre a infecção por *Toxocara* spp., os níveis de eosinófilos e a produção de IgE total (DATTOLI *et al.*, 2011). Outro estudo conduzido com crianças encontrou uma associação positiva entre a soroprevalência de *Toxocara* spp. e eosinofília, IgE total e IgE específica para aeroalérgenos; além de relatar redução da Reatividade do Teste Cutâneo (SPT), não foi observado associação entre a infecção com asma atópica e não atópica (MENDONÇA *et al.*, 2012). A redução do SPT em

indivíduos soropositivos para *Toxocara spp.* pode ser entendida como uma possível imunomodulação induzida pelo parasito, alterando a capacidade das IgE em mediar o SPT, assim como por um aumento de IL-10 suscitado pelo parasito, como descrito por (ALCÂNTARA-NEVES, N. *et al.*, 2014).

HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1

H0) A infecção causada por o *Toxocara* spp. não se transmite por transmissão vertical nos seres humanos;

H1) A infecção causada por *Toxocara* spp. se transmite por transmissão vertical nos seres humanos.

3.1.2

H0) A infecção causada por *Toxocara* spp. não está associada a condições socioeconômicas e ambientais;

H1) A infecção causada por *Toxocara* spp. está associada a condições socioeconômicas e ambientais.

3.1.3

H0) Crianças expostas à infecção por *Toxocara* spp. não apresentam associação com atopia e asma;

H1) Crianças expostas à infecção por *Toxocara* spp. apresentam associação com atopia e asma.

3.2 OBJETIVOS GERAIS:

Determinar a prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Toxocara* spp., avaliar a possibilidade de transmissão vertical e investigar possíveis associações entre *Toxocara* spp. com atopia e asma em um estudo de coorte de mães e crianças, no município de Quinindé, Equador.

3.3 Objetivos específicos:

- Determinar a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mulheres grávidas, no cordão umbilical e nas respectivas crianças desde os 7 meses até 5 anos de idade;
- Verificar possíveis fatores de risco de infecção por *Toxocara* spp. nas diferentes idades;
- Avaliar a cinética da transmissão do *Toxocara* spp. em crianças desde 7 meses até os 5 anos;
- Verificar possíveis associações de *Toxocara* spp. com atopia e asma em crianças de 5 anos.

4.0 CAPÍTULO 1: Manuscrito 1

Título. Soroprevalência de *Toxocara* spp. em mulheres grávidas, transmissão congênita da toxocaríase e fatores associados à infecção numa coorte de mães e crianças até os 7 meses de idade do município de Quinindé-Ecuador

RESUMO

Introdução: Toxocaríase é uma zoonose negligenciada causada por larvas de *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, parasitos de cães e gatos respectivamente. Esta doença tem sido relatada em todo o mundo, porém a prevalência é maior nas regiões tropicais e subtropicais em populações de baixa renda. Em cães e gatos, os hospedeiros definitivos, a infecção ocorre por via oral – fecal, transmamária e transplacentária. Estudos experimentais em modelo murino têm demonstrado a ocorrência de transmissão vertical. Infecções por helmintos durante a gravidez podem estar associadas à distúrbios reprodutivos. Além disso, estudos sobre a ocorrência de toxocaríase na gravidez e de transmissão vertical em humanos são escassos.

Objetivo: Determinar a soroprevalência de *Toxocara* spp. em mulheres grávidas, em cordões umbilicais e em crianças até os 7 meses e possível transmissão vertical da toxocaríase, além de avaliar os fatores de risco desta infecção em um estudo de coorte de mães e crianças no município de Quinindé, Equador. **Metodologia:** Foram estudadas 290 mulheres gestantes e seus filhos de até 7 meses. Os anticorpos anti-*Toxocara* spp. foram determinados no soro e cordão umbilical por ELISA indireto de avidéz. O ponto do corte para detecção de IgG anti-*Toxocara* spp. foi de 0,273. **Resultados:** Após as análises, obteve-se o seguinte resultado: A soroprevalência de IgG anti-*Toxocara* spp. nas mulheres grávidas foi de 80,7% e no sangue dos cordões foi de 84,1%. Todas as crianças até o sétimo mês foram soronegativas. O índice de avidéz encontrado foi maior do que o ponto do corte estabelecido >50%, indicando uma alta avidéz o que caracteriza infecção crônica. Quanto aos fatores de risco da infecção por *Toxocara* spp. investigados, o único encontrado nas mães foi morar em área rural. **Conclusão:** Soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mulheres grávidas moradores de Quinindé é elevada e a análise de avidéz mostra a infecção crônica, indicando que não houve transmissão da mãe para filho. Poucos são os realizados estudos de soroprevalência no Equador, e isso demonstra a necessidade de cuidados, pois viver com animais de estimação pode aumentar o risco de contrair esta infecção parasitária negligenciada.

Palavras-chave: ELISA de avidéz. Fatores de risco. Mulheres grávidas. Toxocaríase.

Seroprevalence of *Toxocara* spp. In pregnant women, congenital transmission of toxocariasis and factors associated with infection in a cohort of mothers and children up to 7 months of age in the municipality of Quinindé-Ecuador

SUMMARY

Introduction: Toxocariasis is a human neglected zoonosis caused by larvae of *Toxocara canis* and *T. cati*, parasites of dogs and cats respectively. This disease has been reported worldwide, but the prevalence is higher in tropical and subtropical regions in low-income populations. In dogs and cats, the definitive hosts, the infection occurs orally - fecal, mammary and transplacental (in dogs). Experimental studies in murine model have demonstrated the occurrence of vertical transmission. Helminth infections during pregnancy may be associated with reproductive disorders. In addition, studies on the occurrence of toxocariasis in pregnancy and vertical transmission in humans are scarce. **Objective:** To determine the seroprevalence of *Toxocara* spp. in pregnant women, umbilical cords and children at 7 months and possible vertical transmission of toxocariasis. In addition, to evaluate the risk factors of this infection in a cohort study of mothers and children in Quinindé, Ecuador. **Methodology:** 290 pregnant women and their children up to 7 months were studied. Anti-*Toxocara* spp. IgG were determined in serum and umbilical cord by indirect avidity ELISA. The cut-off point for detection of anti-*Toxocara* spp. IgG was 0.273. **Results:** Seroprevalence of anti-*Toxocara* spp. IgG in pregnant women was 80.7% and in cord blood was 84.1%. All children up to the seventh month were seronegative. The avidity index found was greater than the established cutoff point > 50%, indicating a high avidity which characterizes chronic infection. Regarding the risk factors for *Toxocara* spp. Infection the only one found in the mothers was to live in rural areas. **Conclusion:** Our data show that seroprevalence of IgG antibodies to *Toxocara* spp. in pregnant women living in Quinindé is high and the avidity analysis shows that the infection that was acquired in the past was chronic, indicating that there was no transmission from mother to child. There are few studies of seroprevalence in Ecuador, demonstrating the need for care, since living with pets may increase the risk of contracting this neglected parasitic infection.

Keywords: Avidity ELISA. Pregnant women. Risk factors. Toxocariasis.

4.1 INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma zoonose negligenciada causada por larvas de *Toxocara* spp. (*T. canis* e *T. cati*). O ser humano é hospedeiro paratênico, e infecção ocorre acidentalmente através da ingestão de ovos embrionados. Esta parasitose possui quadro polimorfo como: Larva Migrans Visceral (LMV), Larva Migrans Ocular (LMO) e formas assintomáticas (BEAVER, 1956; CARVALHO; ROCHA, 2011).

A toxocaríase humana tem sido relatada em todo o mundo, porém a prevalência é maior em regiões tropicais e subtropicais e mais ainda entre populações de baixa renda. A toxocaríase é tão ou mais prevalente do que a ascaridíase em crianças de classe social baixa (SOUZA *et al.*, 2011) e pode afetar qualquer pessoa, sendo a soroprevalência variada: 30% (TORRES; LOPEZ, 2004); 65,4% (SOUZA *et al.*, 2011); 47% (MENDONÇA *et al.*, 2012) 63,6% (SILVA *et al.*, 2016); (FIALHO; CORREA, 2016); 40,1% (KANOBANA *et al.*, 2013), (SCHOENARDIE, E. R. *et al.*, 2013). Em adultos, as prevalências relatada foram de 44,92% (ROLDÁN *et al.*, 2010b) e 25.4% (VARGAS *et al.*, 2016).

Em mulheres grávidas, existem poucos estudos de prevalência, incluindo um estudo realizado no Reino Unido com 33% de taxa de positividade (TAYLOR *et al.*, 1996). Em outro estudo conduzido em Brasília, com mulheres grávidas, a soropositividade para *Toxocara* spp. foi de 6,4% (SANTOS *et al.*, 2015). Nos cães, os hospedeiros definitivos, a transmissão ocorre normalmente por transmissão transmamária e transplacentária, ou seja, o fato de transferir as larvas através da placenta, confirma que, quase todos os filhotes das cadelas prenhas infectadas nascem infectados com *Toxocara* spp. (CARVALHO; ROCHA, 2011). Estudos experimentais em modelo murino, mostram que a transmissão vertical acontece com menor intensidade do que ocorre em cães (SCHOENARDIE, E. *et al.*, 2013).

Em humanos, a forma de contágio é através da ingestão de ovos embrionados presentes em solos contaminados com fezes de animais e alimentos contaminados. Outra forma de contágio poderia ser transplacentária, já que, em infecções experimentais em hospedeiros acidentais, a transmissão pode ocorrer via placenta em infecções agudas.

Um caso de transmissão vertical pelo *Toxocara* spp. foi reportado em que uma criança recém-nascida, diagnosticada como portadora de toxocaríase ocular congênita. Além de retinopatia ela possui eosinofilia elevada, e a mãe apresentou soropositividade para *Toxocara* spp. (MAFFRAND *et al.*, 2006). Estes achados sugerem que as infecções por helmintos na gravidez podem influenciar no desenvolvimento da resposta imune fetal (MPAIRWE;

TWEYONGYERE; ELLIOTT, 2014). Além disso, as infecções por estes parasitos poderiam proteger contra o desenvolvimento de alergia na infância (COOPER *et al.*, 2016).

Existem poucos estudos sobre a prevalência de infecção por *Toxocara* spp. durante e depois da gravidez. No Equador, não existem trabalhos sobre a infecção por *Toxocara* spp. em mulheres grávidas. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mulheres grávidas e a possibilidade de transmissão congênita em um estudo de coorte no município de Quinindé, na província de Esmeraldas, no Equador.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 População do estudo

A população analisada pertence a um estudo de coorte prospectivo que acompanha as crianças desde o nascimento chamado ECUAVIDA, que se encontra em andamento e ocorre em Quinindé, na província de Esmeraldas, no Equador (Figura 1). O estudo maior é formado por 2.404 recém-nascidos que foram recrutados no hospital Pedro Alberto Buffoni do município de Quinindé, durante o período de novembro de 2005 a dezembro de 2009. A área de estudo tem um clima tropical, a temperatura média anual é de 30 ° C, com uma umidade relativa de 75% e uma altitude de até 200 m. Quinindé tem uma população com aproximadamente 150 mil habitantes que vivem em três municípios e seis comunidades rurais. Sua economia é baseada principalmente em atividades agrícolas, como plantação e colheita de palma africana, palmito e cacau, sendo a palma africana considerada como a fonte econômica principal. A população de estudo tem saneamento e serviços básicos limitados, assim como acesso limitado a serviços de água potável.

A amostra do presente estudo foi composta de 290 mulheres e seus filhos, selecionadas de 300 gestantes que moravam próximo ao hospital, que tiveram partos sem complicações e participavam de um projeto chamado de coorte imunológico.

Figura 1. Localização geográfica das áreas de recrutamento da população do estudo.

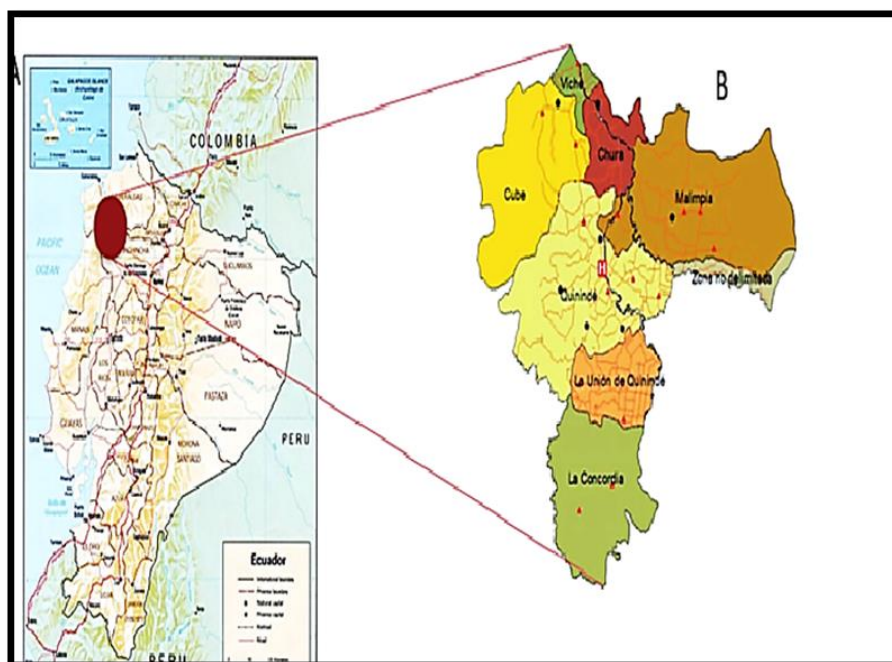


Figura 1. Local da população estudada. (A) Mapa do Equador mostrando localização do distrito de Quindí, Província de Esmeraldas, Equador e localização geográfica das famílias da coorte. (Círculo sombreado) (cortesia do General Bibliotecas, Universidade do Texas em Austin, TX). A área de recrutamento para o coorte foi definida pelas fronteiras geográficas deste distrito. (B) Mapa mostrando as paróquias do distrito de Quindí, incluindo La Concordia. H, Hospital Padre Alberto Buffoni. (COOPER *et al.*, 2015).

4.2.2 Consentimentos e Questionários

As mulheres grávidas participantes do estudo assinaram o termo de consentimento pós informado e o protocolo do estudo foi aprovado pelos comitês de ética. As gestantes responderam a um questionário de dados sobre fatores demográficos e socioeconômicos, além de características do agregado familiar e a história obstétrica das mesmas. Um novo questionário foi aplicado aos 7 meses após o parto com o objetivo de valorar as crianças a idade de 7 meses.

4.2.3 Amostras sanguíneas

Foram coletados 3 mL de sangue venosa das mulheres grávidas no momento do parto e dos respectivos cordões umbilicais e dos bebês aos 7 meses de nascidos se coletou sangue venosa, em tubos de plástico (BD Vacutainer, Plymouth, UK), contendo heparina de sódio

como anticoagulante. Depois os tubos de sangue foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos e o plasma foi transferido para tubos tipo Eppendorf, devidamente etiquetados e mantidos em temperatura -20°C até a realização dos ensaios de ELISA para a determinação de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp.

4.2.4 Obtenções do antígeno excretório/secretório de larvas de *Toxocara canis*

O antígeno TES foi preparado pelo método descrito por De Savigny (DE SAVIGNY, 1975) e adaptado por Alcântara - Neves e colaboradores (ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.*, 2008). Os vermes adultos fêmeas de *T. canis* foram obtidos de filhotes de cães após o tratamento com piperazina ou proverme (180 mg/kg p.c.). As fêmeas adultas de *Toxocara canis* foram dissecadas e obtivemos os úteros, destes foram retirados os ovos, os quais foram incubados numa solução de formalina a 2%, na temperatura de 28°C e oxigenados durante 30 dias, até se transformarem em ovos embrionados e com a ajuda de hipoclorito a 5% os ovos foram induzidos a eclosão. As larvas de *T. canis* do terceiro estágio foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ em meio RPMI-1640 suplementado com gentamicina (0,2mg/ml) e anfotericina (2,5 µg/ml). A cada quatro dias as larvas eram recuperadas e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 24°C. O sobrenadante contendo o TES foi coletado e adicionado inibidor de protease (Fluoreto de fenilmesulfonamida (PMSF; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Em seguida o antígeno foi concentrado em filtro Amicon (Miliporecorporate, MA, USA) com membrana de 3 KD. A seguir, o sobrenadante foi dialisado contra uma solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando o método de Folin Wu (Lowry et al. 1951).

4.2.5 Preparo do antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*

Antígenos somáticos foram produzidos para investigação da reatividade cruzada entre *T. canis* e *A. lumbricoides*. Parasitos adultos foram colocados em uma placa de Petri (Os vermes adultos de *A. lumbricoides*, foram cortados transversalmente em fragmentos de aproximadamente 1 mm de comprimento em 10 mL de PBS, pH 7,4 por 2 gramas dos fragmentos dos vermes. Todo o conteúdo foi transferido para um tubo plástico de 50 mL (Falcon, TPP, Suíça), e adicionado 25 µl para cada grama de parasito, de coquetel inibidor de proteases (Sigma/Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, EUA). Os fragmentos foram

submetidos a choque térmico em nitrogênio líquido (5 a 10 ciclos de 30 segundos com intervalo de 30 segundos), cada ciclo intercalado com trituração com homogeneizador de tecidos, realizada em 5 ciclos de 5 minutos. A suspensão dos parasitos foi centrifugada a 10.000 RPM por 10 min. Para dosagem proteica dos antígenos somáticos, foi empregado o método de Folin Wu (Lowry et al., 1951).

4.2.6 Absorções dos soros com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*

As amostras de plasma sanguíneos das mulheres gestantes, dos cordões umbilicais e das crianças ao 7 meses de idade, foram absorvidos com antígeno somático de *A. lumbricoides*, para evitar a reação cruzada entre antígeno de *T. canis* e os anticorpos IgG anti-*Ascaris lumbricoides*. Para tal, os soros foram diluídos em tampão de fosfato de sódio, 0,150 M, pH 7,4 (PBS) contendo polietilenoglicol PEG 15.000 15% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e 0,1% de azida (Sigma Chemical Co. San Louis, MO, EUA). Em seguida os soros foram homogeneizados por 30 minutos a 4°C e centrifugados a 8.500 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi retirado livre de IgG anti-*A. lumbricoides* foram congelados até o uso.

4.2.7 Detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em soros

Os soros foram submetidos ao método de ELISA indireto de acordo com Mendonça e colaboradores (MENDONÇA *et al.*, 2013). Resumidamente, microplacas de polietileno de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno excretório secretório das larvas do *Toxocara canis* (TES) na concentração de 3.5 µg/ml, diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (100µl/poço) e incubadas *overnight* a 4°C. Os locais de ligação livres foram bloqueados com 10% de solução de soro fetal bovino diluído em PBS/Tween-20 /Tween-20 (SIGMA, San Louis, MO, USA) a 0,05% (PBS-T), por um período de uma hora. Os soros foram diluídos a 1:1.000 em PBS/T contendo 2,5 % de soro fetal bovino (GIBCO, América do Sul, Brasil) (PBS/T/SBF) foram adicionados aos poço. Após incubação e lavagens foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humano biotilado (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) diluído a 1/2000 em PBS/T/SFB e as placas foram incubadas. A revelação da reação foi feita com *streptavidina-peroxidase* (Pharmigen San Diego, CA, USA), diluída a 1/1000 em PBS/T/SFB 2,5 seguidas após incubação e lavagens seguido pela adição do cromógeno (OPD, ortofenilenodiamina), (Sigma Chemical Co. San Louis, MO, USA) na concentração de 0,05

mg/ml; a reação de parada foi feita com 25µl de H₂SO₄, 2 N e lida utilizando em leitor de ELISA, usando um comprimento de onda de 450 nm. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente por 60 minutos com exceção do cromógeno que foi incubado por 30 minutos.

O ponto de corte do ensaio (DO=0,273) foi calculado como a média da densidade óptica, mais três desvios padrões das DOs dos soros de 10 mães e de crianças com menos de 2% de eosinófilos no sangue, com exames parasitológicos de fezes negativos e ausência de contato com cães e gatos. Para determinar a avidéz de ligação dos anticorpos ao antígeno, depois da incubação dos soros, uma duplicata do cada soro foi tratada com ureia 6 M (Ureia Sigma Chemical Co. San Louis, MO, USA) diluída em PBS-T por um período de 10 minutos, e em seguida, o ensaio foi continuado como referido acima. Para determinar o índice de avidéz de IgG anti-*Toxocara* spp., foi usado o cálculo para índice de avidéz relativa: percentagem de redução (PR) = 100 - D.O. soros com ureia x 100/D.O. dos soros sem ureia. Um soro foi considerado de baixa avidéz, quando o PR foi menor que 50% (DZIEMIAN *et al.*, 2008).

4.2.8 Análises estatísticas

Para descrever os dados na amostra estudada, foi utilizada a distribuição de frequências. As seguintes variáveis foram estudadas como fatores de risco para a aquisição da infecção por *T. canis* (resultado): nível de escolaridade das mães, presença de cães ou gatos dentro o fora da casa, etnia, tipo de banheiro, se moravam em superlotação, tinham infecções helmínticas, e se moravam em uma área rural ou urbana. Primeiro, realizamos uma análise univariada entre cada fator potencial de risco e o resultado. Posteriormente, construiu-se um modelo multivariável, com as análises logísticas bivariada e multivariada foram calculadas com razão de chance (*Odds Ratio* - OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%. Na análise multivariada, ficaram no modelo final, as variáveis com significância estatística menor que 20% como educação, renda, superlotação e zona onde moravam. Os dados obtidos foram analisados pelo *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0.

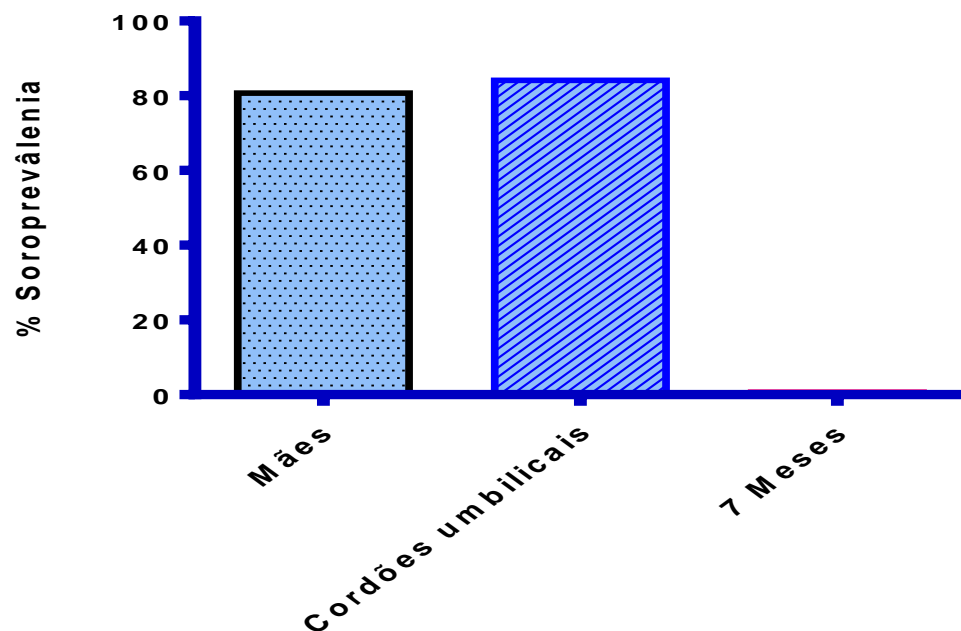
4.3 RESULTADOS

Foram analisadas um total de 290 amostras de soro de mães grávidas, 290 amostras de soro de cordão umbilical e 267 de soro das crianças aos 7 meses, pela técnica ELISA indireto usando como antígeno o TES, para identificar anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. e determinar a soroprevalência, nos diferentes grupos mencionados. No grupo das mães, estes resultados foram associados com fatores de risco para a infecção por *Toxocara* spp.

As mães apresentavam uma idade entre 17 e 30 anos e os partos foram sem complicações. Das mães examinadas, 80,7%(234/290) foram soropositivas para IgG anti-*Toxocara* spp. e 84,1% (244/290) dos cordões umbilicais das crianças foram soropositivos, e todas as crianças de 7 meses foram soronegativas (Figura 2).

Figura 2: Soroprevência de anticorpos IgG anti - *Toxocara* spp. mãe, soro de cordão umbilical e em crianças de 7 meses

A)



B)

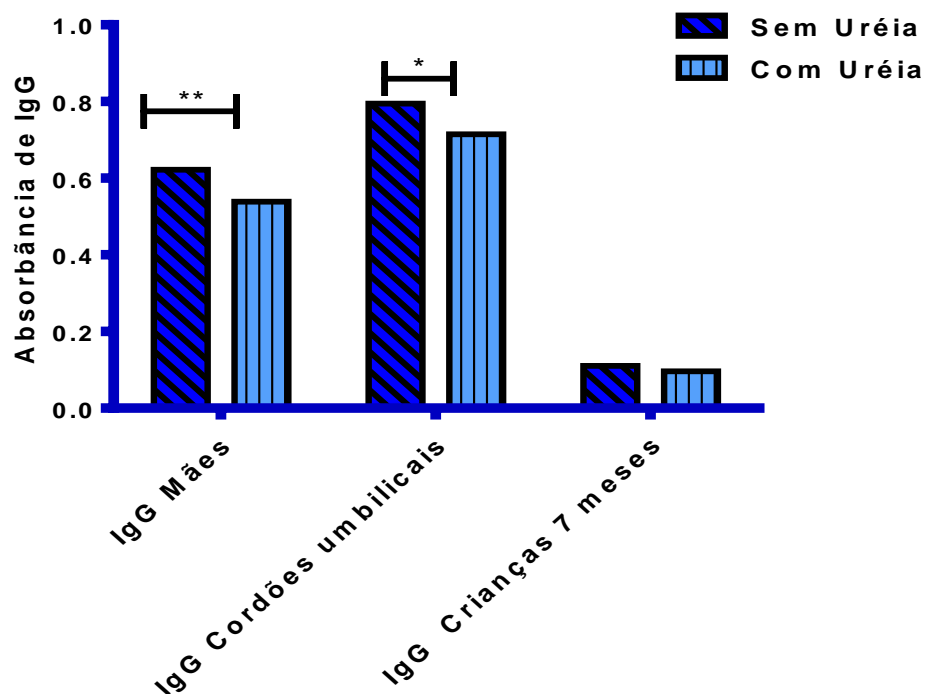


Figura 2. A) Soroprevência de anticorpos IgG anti - *Toxocara* spp. no sangue das mães, sangue do cordão umbilical, e de crianças aos 7 meses. B) Medianas das densidades ópticas dos soros de mães, sangue cordão e das crianças aos 7 meses, antes e após tratamento com ureia. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, teste de Mann Whitney.

Todos os soros das mães e dos cordões umbilicais soropositivos tiveram índice de avididade de IgG anti- *Toxocara* spp. maior que 50%, indicando uma elevada avididade e que as infecções das mães eram crônicas; portanto não houve transmissão vertical da parasitose (Figura 3).

Figura 3- Índice de Avididade de IgG anti – *Toxocara* spp. em soros de mães e de cordões umbilicais.

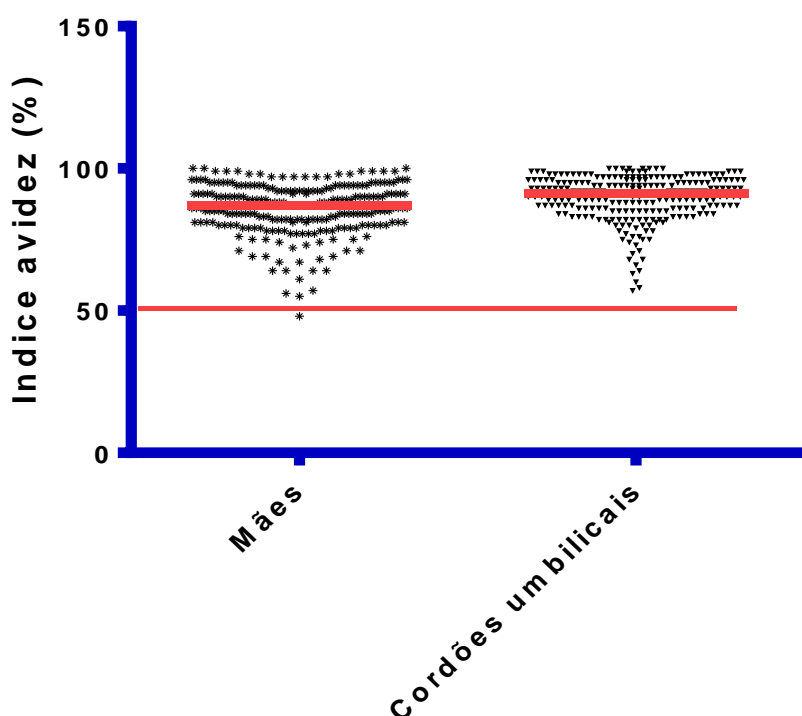


Figura 3- Índice de avididade obtido através do ELISA de IgG anti - *Toxocara* spp. em soros de mães e de cordões umbilicais. Linha indica o *cut-off* para diferenciação entre os grupos baixa e alta avididade (Índice avididade =50 %).

Das 290 mães estudadas, 288 com dados completos participaram da análise de diferentes variáveis associadas com a presença de soropositividade ao *Toxocara* spp. Destas, 232 mães soropositivas, 146 (80,7%) estudaram até a primário; 111 (81,0%) ganhavam um salário menor que o básico 104 (85,2%) moravam em superlotação e 67 (75,3%) moravam em uma zona rural.

Entretanto, a análise multivariada demonstrou que morar em uma zona rural tem uma associação negativa significativa ($OR_{Ajustada} = 0,51$ 95% IC = 0,77- 0,97) utilizou-se análises univariada e multivariada de variáveis como educação, renda e superlotação, mas não foram estatisticamente significantes (**Tabela 1**)

Tabela 1. Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti-*Toxocara* spp. em 290 mães de um estudo de coorte no município de Quindé, Equador, 2005 - 2009

Fatores de risco	n =*288	IgG anti- <i>Toxocara</i> spp.			
		Negativo n =56 (19,4%)	Positivo n =232 (80,6%)	OR Bruta (IC 95%)	OR Ajustada** (IC 95%)
Idade					
>= 30 anos	70 (24,3)	13 (18,6)	57 (81,4)	1	
<= 20 anos	76 (26,4)	12 (15,8)	64 (84,2)	1,22 (0,51 - 2,88)	***
21 – 29 anos	142(49,3)	31 (21,8)	111 (78,2)	0,82 (0,40 - 1,68)	***
Educação materna					
Secundária	56 (19,4)	15 (26,8)	41 (73,2)	1	1
Primária	181 (62,8)	35 (19,3)	146 (80,7)	1,02 (0,56 - 1,06)	1,54 (0,75 - 3,15)
Analfabeta	51 (17,7)	6 (11,8)	45 (88,2)	2,00 (0,81 - 4,97)	2,78 (0,93 - 8,26)
Etnia					
Afro Equatoriano	90 (31,1)	19 (21,1)	71 (78,9)	1	
Mestiço	198 (68,8)	37 (18,7)	161 (81,3)	1,16 (0,63 - 2,16)	***
Salário base					
>=240	211 (73,3)	37 (17,5)	121 (80,1)	1	1
<240	77 (26,7)	19 (24,7)	111 (81,0)	1,54 (0,82 - 2,89)	1,50 (0,78 - 2,91)
Tipo de banheiro					
Banheiro	93 (32,3)	17 (18,3)	76 (81,7)	1	
Latrina/campo	195 (67,7)	39 (20,0)	156 (80,0)	0,89 (0,47 - 1,68)	***
Cães dentro de casa					
Não	241 (83,7)	47 (19,5)	194 (80,5)	1	
Sim	47 (16,3)	9 (19,1)	38 (80,9)	1,02 (0,46 - 2,26)	***
Cães fora da casa					
Não	73 (25,3)	16 (21,9)	57 (78,1)	1	
Sim	215 (74,7)	40 (18,6)	175 (81,4)	1,28 (0,64 - 2,36)	***
Gato dentro de casa					
Não	241 (83,7)	48 (19,9)	193 (80,1)	1	
Sim	47 (16,3)	8 (17,0)	39 (83,0)	1,21 (0,53 - 2,76)	***
Gato fora da casa					
Não	174 (60,4)	36 (20,7)	138 (79,3)	1	
Sim	114 (39,6)	20 (17,5)	94 (82,5)	1,23 (0,67 - 2,25)	***
Superlotação do domicílio					
Não	166 (57,6)	38 (22,9)	128 (77,1)	1	1
Sim	122 (42,4)	18 (14,8)	104 (85,2)	1,71 (0,92 - 3,18)	1,50 (0,79 - 2,85)
Zona de moradia					
Urbana	199 (69,1)	34 (17,1)	165 (82,9)	1	1
Rural	89 (30,9)	22 (24,7)	67 (75,3)	0,63 (0,54 - 1,15)	0,51 (0,77 - 0,97)
Infecção por helmintos					
Não	151 (52,4)	30 (19,9)	121 (80,1)	1	
Sim	137 (47,6)	26 (19,0)	111 (81,0)	1,54 (0,82 - 2,89)	***

* Análise realizada com 288 mulheres grávidas que tinham todas as variáveis.

** Ajustadas por escolaridade, salário básico, superlotação e zona.

***Variáveis excluídas do modelo multivariado por ter um valor de p superior a 0,20.

4.4 DISCUSSÃO

As mães aqui estudadas eram oriundas de um estudo prospectivo de crianças desde os nascimentos, feito em um distrito rural da província de Esmeraldas, município de Quinindé, Equador. Neste trabalho, examinamos se existiam anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mulheres grávidas, nos soros dos cordões umbilicais e em crianças aos 7 meses, e se a soropositividade está associada a algum fator de risco.

Existem poucos dados publicados sobre a soroprevalência de IgG anti-*Toxocara* spp. na gravidez e uma possível transmissão congênita da toxocaríase. Nossos dados indicam que a soroprevalência de IgG anti-*Toxocara* spp. das mulheres grávidas foi de 80,7%, de 84,1% em soro de cordão umbilical, e 0% nas crianças aos 7 meses, indicando que a taxa de infecção é alta, embora não tenha ocorrido transmissão aos filhos. A toxocaríase é uma zoonose negligenciada, que requer a atenção e ações em saúde pública segundo reportam os Centros para Controle e Prevenção de Doenças (CDC).

O presente estudo nos sugere que esta alta prevalência, e o fato de nunca ter sido estudada anteriormente nessa comunidade seja decorrente da toxocaríase ser uma parasitose negligenciada, com diagnóstico limitado e que não é feito como rotina. Por ser também uma doença que cursa principalmente de forma assintomática, com sintomas não específicos na maioria dos casos, passa despercebida e pode afetar pessoas com diferentes idades.

Um estudo realizado em uma comunidade em Santa Lúcia no Caribe, em crianças de seis meses a seis anos de idade, reportou uma prevalência de 86% (THOMPSON *et al.*, 1986). Outro estudo feito por (FU, C. *et al.*, 2014), em crianças de 7 a 12 anos das Ilhas Marshall (Taiwan), encontrou uma soroprevalência de 86,75%. As altas prevalências relatadas são semelhantes aquela observada em nosso estudo, assim como as condições de vida e saneamento das populações avaliadas.

A soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. no grupo de mulheres grávidas deste estudo foi maior quando comparada com outros estudos. Um trabalho feito nos Estados Unidos por (TAYLOR *et al.*, 1996) mostrou a prevalência de 33%, em um grupo de mães grávidas pareadas com os soros de cordão umbilical, onde não encontrou anticorpos de tipo IgM em sangue do cordão. Na China, em um estudo transversal realizado em indivíduos sadios, psiquiátricos e mulheres grávidas a prevalência foi de 9,19% (CONG, W *et al.*, 2014). No Brasil, na cidade de Brasília-DF, encontrou-se uma prevalência de 6,5% (SANTOS *et al.*, 2015)

Em Salvador, no Estado da Bahia/Brasil, Rodrigues e colaboradores encontram em uma população de adultos, 65% de prevalência (SOUZA *et al.*, 2011), enquanto que Mendonça e colaboradores reportaram uma prevalência de 46% em crianças de 4 a 11 anos (MENDONÇA *et al.*, 2013).

O estudo de avidéz de anticorpos IgG permite diferenciar se uma infecção é recente ou tardia. Anticorpos com alta avidéz representam uma infecção tardia, enquanto os de baixa avidéz descartam a possibilidade de infecção tardia, e sugerem que a infecção é recente. Entretanto, a confirmação se a infecção é recente pode ser feita através da identificação de anticorpos IgM.

As análises de avidéz de IgG, dos soros das mães e dos cordões umbilicais neste estudo mostraram que todos os soros estavam acima do ponto do corte de 50%, indicando que as mães se infectaram no passado e a infecção é de fase crônica. Além disto, demonstra se os títulos presentes no sangue de cordão foram transmitidos pelas mães durante a gravidez. Isso mostra que não houve uma transmissão do *Toxocara* spp. da mãe para o feto. Levando em consideração as pesquisas, em modelos animais, a transmissão acontece com mais frequência na fase aguda na gravidez (SCHOENARDIE, E. *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstraram que os anticorpos de IgG anti-*Toxocara* spp. foram produzidos em resposta a infecção por *Toxocara* anterior a gravidez.

Como já é mencionado anteriormente os anticorpos da classe IgG atravessam a placenta, passando da mãe para o feto durante a gravidez. Os níveis de anticorpos IgG da mãe frequentemente está correlacionados com os de sangue cordão (CASANOVA, 2003; KRISTOFFERSEN, 2000; TOIVANEN; MANTYJARVI; HIRVONEN, 1968). Isto dependerá do nível de IgG da mãe, quanto mais anticorpos são transferidos pode saturar o receptor do feto (FcRn), de forma que ele não recebe mais IgG. Então, quando a mãe tem níveis elevados no sangue, o do cordão será menor, mas se a mãe tem níveis medianos, pode haver um maior nível de IgG no cordão umbilical. Por outro lado, existem pesquisas anteriores que detectaram níveis de anticorpo de IgG sangue do cordão mais elevados que os da mãe (MANTYJARVI; HIRVONEN; TOIVANEN, 1970; OKOKO *et al.*, 2001; VAN DEN BERG *et al.*, 2014).

Nosso estudo observou que isso acontece mostrando que os títulos de anticorpo IgG anti - *Toxocara* spp. dos cordões se apresentaram mais altos que das mães (OD 0,622 - 0,794). Assim os níveis de anticorpos totais e específicos transmitidos da mãe para o feto vai

dependem de alguns fatores, tais como: o tipo de subclasse de IgG; natureza dos antígenos; idade gestacional e alterações placentárias (PALMEIRA *et al.*, 2012).

Nos hospedeiros definitivos do *Toxocara* spp., como nos cães, a transmissão das larvas de *T. canis* ocorre através da placenta ou através do leite materno durante a amamentação de seus filhotes. Nas cadelas gestantes, as larvas que ficaram em estado dormente nos tecidos se reativam e este processo acontece durante o 42º dia (PARSONS, 1987; SCHNIEDER; LAABS; WELZ, 2011). Desta forma, supõe-se que eventos fisiológicos dos hospedeiros estão associados com a reativação das larvas. Além disso, as cadelas prenhes têm uma característica especial, de que a transmissão vertical aconteça até duas gestações subsequentes, por conta da duração do tempo de vida das larvas que podem ficar em estado dormente por 358 dias nos hospedeiros definitivos como os cães, (SCHNIEDER; LAABS; WELZ, 2011); e então, essas larvas poderiam alcançar uma segunda gestação (OVERGAAUW; NEDERLAND, 1997).

Várias pesquisas têm descrito o processo de detecção, reativação e migração das larvas de *T. canis* nas cadelas grávidas e que este efeito possui influências provavelmente pelo hormônio prolactina (OSHIMA *et al.*, 1961) referido por PRESS, 2016. Reporta-se que a administração de prolactina em modelos experimentais de camundongos reduz o número de larvas presas nos tecidos (JIN; AKAO; OHTA, 2008). Foi observado que a migração das larvas de *T. canis* acontece da mãe para seus filhos através da sucção da glândula mamária e este efeito foi promovido pela aplicação parenteral da prolactina nos camundongos. Essas observações sugerem que a reativação da larva é causada pelo efeito direto do hormônio prolactina no desenvolvimento da larva do *Toxocara* spp., no entanto, a reativação pode ser também causada pelo efeito dos hormônios na fisiologia ou na resposta imune do hospedeiro. Este efeito da prolactina ajudaria a estimulação das larvas e influenciaria em seu crescimento e movimentação, ajudando a elas a migrarem pela placenta até chegar aos filhotes (IGNACAK *et al.*, 2012).

Modelos *in vitro* mostram como o hormônio prolactina é capaz de ativar as larvas dormentes na gravidez e o poder de transmitir a seus filhos as larvas através da placenta e via mamária. As células são ativadas por hormônios, neste caso pela prolactina, e isto se deve aos receptores específicos (PRLr) e, portanto, as células com receptores específicos são alvo desse hormônio em particular. Outra possibilidade é que o *T. canis* está adaptado evolutivamente a reconhecer a prolactina de seu hospedeiro definitivo, e isto se deve à sequência do fragmento das larvas que mostrou uma similitude com o fragmento gênico que codifica o receptor de

prolactina (PRL-R) do cão doméstico. Isso indica que existe uma similaridade entre a larva e os receptores de prolactina, provavelmente unicamente se ativam as larvas dormentes nos cães (hospedeiros definitivos) (CHÁVEZ-GÜITRÓN *et al.*, 2016).

Em hospedeiros acidentais, como no caso dos seres humanos, é pouco frequente a transmissão transplacentária, porém existiu um caso de retinopatia de um recém-nascido (MAFFRAND *et al.*, 2006). Maffrand e colaboradores, relataram que não encontraram anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. na criança, mas sim na mãe, e que a larva transpassou a placenta e migrou até os olhos, causando uma retinopatia. Isto quer dizer que vai depender da carga parasitária da mãe e a infecção tende acontecer na fase aguda, pelo menos no último trimestre de gestação, para que possa acontecer uma possível transmissão nos seres humanos. Desta forma, pode-se supor que, diferentemente das cadelas, onde os hormônios ativam as larvas dormente do *T. canis*, os hormônios presentes nas mulheres grávidas não foram capazes de ativar as larvas dormentes, e que possivelmente isso pode ocorrer no ser humano.

Um dos fatores de risco para a infecção causada por *T. canis* é ter cães e gatos em casa; já que estes animais são um reservatório importante e os hospedeiros principais destes parasitos. Existem alguns estudos que mostram essa associação (FU, C. *et al.*, 2014; MANINI *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2013).

Na população estudada, podemos observar que não houve associações significantes entre os possíveis fatores de risco estudados e a presença de *Toxocara* spp.; provavelmente a alta prevalência encontrada dificultou as análises logísticas, diminuindo seu poder. Além disto, possivelmente uma alta contaminação dos solos das ruas e outros ambientes coletivos como por exemplo, os parques, impedem o reconhecimento do contato dos animais domésticos como fator de risco de aquisição desta helmintíase. Nossos resultados mostraram que independentemente de ter dentro ou fora de casa os animais de estimação, apesar de serem os principais contaminantes para o ser humano, não encontramos uma relação. Por outro lado um estudo piloto feito na China por Cong encontrou uma associação significativa com a presença de cães em casa, e o contato com cães e gatos se configuram como fatores de risco para *Toxocara* spp. (CONG, W *et al.*, 2014). Outro estudo feito no Brasil encontrou associação com contato com cães e com um baixo *status* socioeconômico (SANTOS *et al.*, 2015).

Apesar de não encontrarmos associação entre ter animais de estimação e outras fontes da infecção na população estudada, podemos dizer que, em Quinindé, tem muitos cães de rua. Estes eliminam seus ovos embrionados nos solos, facilitando o contágio direto com o ser

humano. Em Quinindé, não existe legislação alguma sobre o controle canino e há muitos cães nas ruas que acabam eliminando seus excretos em qualquer lugar. Existe uma alta população canina nas casas de Quinindé, onde não existe um controle de vermifugação e as cadelas emprenham frequentemente. As crias, em sua maioria, já nascem infectadas com muitos vermes, eliminando seus ovos no solo, que podem ser transmitido as pessoas da comunidade. Provavelmente, a alta exposição, os baixos níveis de higiene e a falta de saneamento básico poderiam levar a alta soroprevalência.

O diagnóstico no ser humano pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. não é feito de rotina, por isso pessoas infectadas podem permanecer não diagnosticadas as larvas de *Toxocara* spp. pode migrar nos tecidos do hospedeiro acidental por muitos períodos, e permanecer vivas nos tecidos levando a continuo estímulo antigênico. Isto eleva os níveis da IgG, bem como as reinfecções constantes que as pessoas estão expostas, por não existir controle em animais de estimação.

A tendência da soroprevalência do *Toxocara* spp. ser alta ou baixa vai depender do local onde os estudos foram realizados (zona urbana ou zona rural). Além disso, existe um fator que poderia influenciar com maior frequência em países desenvolvidos, como no caso da migração global seja na rural, ou seja na área urbana (MACPHERSON, 2013). Existem estudos que mostram que pessoas que moram em zonas urbanas ou rurais podem se contagiar com o *Toxocara* spp., como é caso dos Estados Unidos, país no qual pode-se encontrar muitos emigrantes (WON *et al.*, 2008).

Comparando as zonas de residências urbana às residências de zona rural de países desenvolvidos e em desenvolvimentos são diferentes. Nossos resultados indicam que, a maioria das mães soropositivas de nossa população moram mais em áreas urbanas, quando comparado com a zona rural, observamos que existiu uma associação negativa morar em zona rural (OR Ajustada = 0,51; CI 95 % = (0,77-0,97). Uma possibilidade seria o número de soropositivas que é menor na área rural; também as casas são dispersas e os animais de estimação ficam fora das casas, e eliminam suas excretas mais longe das pessoas; outra alternativa seria que Quinindé possui áreas urbanas com características de áreas rurais, com muito terreno baldio onde cães e gatos defecam livremente, e o contágio aumenta independente de morar em zona urbana ou rural.

4.5 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.* An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 349–351, 2008.
- BEAVER, P. C. Larva migrans. **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 6, p. 587–621, 1956.
- CARVALHO, E. A.; ROCHA, R. L. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 2, p. 100–110, 2011.
- CASANOVA, L. D. Concentrações séricas de imunoglobulinas em sangue do funículo umbilical e em sangue materno. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 159–166, 2003.
- CHÁVEZ-GÜITRÓN, L. *et al.* The in vitro effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 33–38, 2016.
- CONG, W. *et al.* *Toxocara* seroprevalence among clinically healthy individuals, pregnant women and psychiatric patients and associated risk factors in Shandong Province, Eastern China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3082, 2014.
- COOPER, P. J. *et al.* Cohort Profile: The Ecuador Life (ECUAVIDA) study in Esmeraldas Province, Ecuador. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 5, p. 1517–1527, 2015.
- COOPER, P. J. *et al.* Effects of maternal geohelminth infections on allergy in early childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 3, p. 899–906.e2, 2016.
- DE SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **The Journal of parasitology**, v. 61, n. 4, p. 781–2, 1975.
- DZIEMIAN, E. *et al.* Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30 p. 187–190, 2008.
- FIALHO, P. M. M.; CORREA, C. R. S. A systematic review of toxocariasis: A neglected but high-prevalence disease in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1193–1199, 2016.
- FU, C. *et al.* Seroepidemiology of *Toxocara Canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 261, 15 dez. 2014.
- IGNACAK, A. *et al.* Prolactin - Not only lactotrophin a “new” view of the “old” hormone. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 435–443, 2012.
- JIN, Z.; AKAO, N.; OHTA, N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasitology International**, v. 57, n. 4, p. 495–498, 2008.
- KANOBANA, K. *et al.* *Toxocara* seropositivity, atopy and asthma: A study in Cuban schoolchildren. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 4, p. 403–406, 2013.

KRISTOFFERSEN, E. K. Placental Fc receptors and the transfer of maternal IgG. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, n. 3, p. 234–243, 2000.

MACPHERSON, C. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 999–1008, 2013.

MAFFRAND, R. *et al.* [Congenital ocular toxocariasis in a premature neonate]. **Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)**, v. 64, n. 6, p. 599–600, jun. 2006.

MANINI, M. *et al.* Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 48–52, 2012.

MANTYJARVI, R.; HIRVONEN, T.; TOIVANEN, P. Maternal antibodies in human neonatal sera. **Immunology**, v. 18, n. 3, p. 449–451, 1970.

MENDONÇA, L. *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 90–95, 2013.

MENDONÇA, L. *et al.* *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1–9, 2012.

MPAIRWE, H.; TWEYONGYERE, R.; ELLIOTT, A. Pregnancy and helminth infections. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 328–337, 2014.

OKOKO, B. J. *et al.* Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 19, n. 2, p. 59–65, 2001.

OVERGAAUW, P.; NEDERLAND, V. Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Toxocarosis in Dogs and Cats. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 233–251, 1997.

PALMEIRA, P. *et al.* IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

PARSONS, J. C. Ascarid infections of cats and dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 17, n. 6, p. 1307–39, 1987.

PRESS, A. Influence of Pregnancy and Lactation on Migration of the Larvae of *Toxocara canis* in Mice Author (s): Tomoo Oshima Published by: Allen Press on behalf of **The American Society of Parasitologists** Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3275080> REFERENCE. v. 47, n. 4, p. 657–660, 2016.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Diagnostico de la toxocarosis humana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 2010.

SANTOS, P. C. *et al.* The seropositivity of *Toxocara* spp. antibodies in pregnant women attended at the university hospital in Southern Brazil and the factors associated with infection.

PLoS ONE, v. 10, n. 7, p. 1–10, 2015.

SCHNIEDER, T.; LAABS, E.; WELZ, C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 193–206, 2011.

SCHOENARDIE, E. *et al.* Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 403–406, set. 2014.

SCHOENARDIE, E. *et al.* Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 623–6, 2013.

SCHOENARDIE, E. R. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 537–539, 2013.

SILVA, M. *et al.* Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, p. 1–7, 2016.

SOUZA, R. *et al.* [Prevalence and risk factors of human infection by *Toxocara canis* in Salvador, State of Bahia, Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 516–519, 2011.

TAYLOR, M. R. H. *et al.* *Toxocara* titres in maternal and cord blood. **Journal of Infection**, v. 32, n. 3, p. 231–233, 1996.

THOMPSON, D. E. *et al.* Epidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 2, p. 283–290, 1986.

TOIVANEN, P.; MANTYJARVI, R.; HIRVONEN, T. Maternal Antibodies in Human Foetal Sera at Different Stages of Gestation. **Immunology**, v. 15, n. 395, 1968.

TORRES, H. E.; LOPEZ, C. A. Exposición ambiental a toxocariosis como factor asociado al asma en niños de edad escolar. 2004. **Anuario de Investigaciones Médicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador**, v. 1, p. 67–74, 2004.

VAN DEN BERG, J. P. *et al.* Lower transplacental antibody transport for measles, mumps, rubella and varicella zoster in very preterm infants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

VARGAS, C. *et al.* Frequency of anti- *toxocara* spp. antibodies in individuals attended by the centro de salud familiar and environmental contamination with *toxocara canis* eggs in dog feces, in the coastal niebla town, Chile. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 1–7, 2016.

WON, K. *et al.* National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 552–557, 2008.

5.0 CAPITULO 2: Manuscrito 2

Título: Soroprevalência de toxocaríase em crianças de 7 a 60 meses de idade; e análise da cinética da soropositividade e associação com asma em Quinindé, Esmeraldas, Equador.

RESUMO

Introdução: A infecção humana pelo *Toxocara spp.* (*T. canis* e *T. cati*) pode ocasionar síndromes denominadas de toxocaríase visceral (ou larva migrans visceral), toxocaríase ocular e a toxocaríase oculta. Normalmente, a infecção humana se dá pela ingestão de ovos embrionados presentes no solo, água ou alimentos. Os seres humanos atuam como um hospedeiro acidental de *Toxocara canis* e *Toxocara cati*. A soroprevalência de infecção por *Toxocara spp.* é elevada em países tropicais, maior em crianças. *Toxocara spp.* pode ser um fator de risco importante para asma em seres humanos. **Objetivo:** Investigar a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara spp.* em crianças dos 7 aos 60 meses, analisar a cinética da infecção ao longo do tempo, avaliar possíveis fatores de risco da infecção, além de averiguar uma possível associação entre a soropositividade para IgG anti-*Toxocara spp.* com atopia e asma em crianças de cinco anos. **Métodos:** A população foi composta por 290 crianças estudadas em diferentes idades de 7 a 60 meses. As crianças fazem parte de um estudo de coorte prospectivo realizado em Quinindé-Ecuador em 2005. Assim, utilizamos como metodologia a aplicação de um questionário epidemiológico, as amostras de sangue foram coletadas e a asma foi determinada através da presença de sibilância nos últimos 12 meses. A soroprevalência de *Toxocara spp.* foi determinada por ELISA indireto, a análise da cronicidade da infecção foi feita com IgG de avidéz, ambos foram realizados usando como antígeno produtos excretores-secretores da larva de *Toxocara canis*. O ponto de corte do ensaio foi de 0,273. **Resultados:** A soroprevalência de *Toxocara spp.* nas crianças de 7 meses foi de 0,0%, aos 13 meses foi de 9,3%, aos 24 meses foi de 48,4%, aos 36 meses foi de 64,9% e aos 60 meses de 80,9%. A análise de incidência, a cada ano, nas crianças foi maior aos 24 meses com 36,2%. Todas as crianças mostram infecção crônica. Os fatores de risco da infecção por *Toxocara spp.* nas crianças de 13 meses foi a presença de cães em casa (OR Ajustada = 5,16 95% IC = 1,16 - 23,08). Aos 24 meses, presença de cães em casa (OR Ajustada = 2,03 95% IC = 1,02-4,04) e a presença de helmintos (OR Ajustada = 2,40 95% IC = 1,08-5,37) são fatores de risco para infecção por *Toxocara spp.* Aos 36 meses, ser do sexo masculino (OR Ajustada = 1,70 95% IC = 1,00 - 2,93), presença de gato em casa (OR Ajustada = 2,24 95% IC = 1,28-3,93) e infecções helmínticas (OR Ajustada = 1,85 95% IC = 0,99-3,62) são fatores de risco para infecção por *Toxocara spp.* Com 60 meses ser do sexo masculino (OR Ajustada = 1,88 IC = 0,95-3,70) e infecções helmínticas (OR Ajustada = 2,62 95% IC = 0,97-7,08) são fatores de risco para infecção por *Toxocara spp.* Os índices de eosinofilia acima de 4% foram de 13,3 % aos 13 meses; 34,6 % aos 24 meses; 45,0 % aos 36 meses e de 54,2 % aos 60 meses. A prevalência de sibilo aos 60 meses foi de 19,1%, a de rinite foi de 17,4 %, de atopia a ácaro foi de 13,1% e a de atopia a qualquer alérgeno foi de 21,2%. Os resultados mostram que não houve associação com os marcadores alérgicos. **Conclusões:** As crianças do estudo começam a infectar-se com *Toxocara spp.* aos 13 meses de idade e vão aumentando a prevalência ao longo do tempo, chegando a uma prevalência elevada aos cinco anos, com 80,9%. A infecção é crônica e os anticorpos persistem por longos períodos. Não houve associação entre presença de sorologia positiva para *Toxocara spp.* e asma.

Palavras-chave: Asma. Fatores de risco. Incidência. Persistência. Soroprevalência. Toxocaríase.

Seroprevalence of *Toxocara* spp. In children from 13 to 60 months of age and analysis of infection kinetics and possible association with asthma in a population Quinindé-Esmeraldas, Ecuador

SUMMARY

Introduction: Human infection with *Toxocara* spp. (*T. canis* and *T. cati*) can lead to syndromes called visceral toxocariasis (or visceral larva migrans), ocular toxocariasis and occult toxocariasis. Usually, the human infection occurs by ingesting embryonated eggs in soil, water, or food. Humans act as an accidental host of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*. The seroprevalence of *Toxocara* spp. is high in tropical countries, higher in children. *Toxocara* spp. may be an important risk factor for asthma in humans. **Objective:** To investigate the seroprevalence of IgG antibodies to *Toxocara* spp. in children from 7 to 60 months, to analyze the kinetics of infection over time, to evaluate possible risk factors of the infection and to investigate a possible association between seropositivity for anti-*Toxocara* spp. IgG with atopy and asthma in five-year-old children. **Methods:** The population was composed of 290 children studied in different ages from 7 to 60 months. The children are part of a prospective cohort study conducted in Quinindé-Ecuador in 2005. An epidemiological questionnaire was performed, blood samples were collected and asthma was determined as the presence of wheezing in the last 12 months. The seroprevalence of *Toxocara* spp. was determined by indirect ELISA, analysis of infection chronicity was done with avidity IgG, both were performed using excretory-secretory products of *Toxocara canis* larvae as antigen. The cut-off point of the test was 0.273. **Results:** The seroprevalence of *Toxocara* spp. in 7-month-old children was 0.0%, at 13 months it was 9.3%, at 24 months was 48.4%, at 36 months was 64.9% and at 60 months was 80.9%. The incidence analysis, each year, in children was higher at 24 months, with 36.2%. All children show chronic infection. The risk factors for *Toxocara* spp. in children of 13 months was the presence of dogs at home (adjusted OR = 5.16 95% CI = 1.16 - 23.08). At 24 months, presence of dogs at home (Adjusted OR = 2.03 95% CI = 1.02-4.04) and presence of helminths (Adjusted OR = 2.40 95% CI = 1.08-5.37) are risk factors for *Toxocara* spp. infection. At 36 months, to be male (Adjusted OR = 1.70 95% CI = 1.00 - 2.93), cat presence at home (adjusted OR = 2.24 95% CI = 1.28-3.93) and helminthic infections (Adjusted OR = 1.85 95% CI = 0.99-3.62) are risk factors for *Toxocara* spp. infection. With 60 months being male (Adjusted OR = 1.88 CI = 0.95-3.70) and helminthic infections (Adjusted OR = 2.62 95% CI = 0.97-7.08) are risk factors for *Toxocara* spp. infection. Eosinophilia rates above 4% were 13.3% at 13 months, 34.6% at 24 months, 45.0% at 36 months and 54.2% at 60 months. The prevalence of: wheezing was 19.1%, rhinitis was 17.4%, atopy to mite was 13.1% and atopy to any allergen was 21.2%. The results show that there was no association with allergic markers. **Conclusions:** Children in the study got infected with *Toxocara* spp. at 13 months and prevalence increase over time, reaching a high prevalence at five years, with 80.9%. The infection is chronic and the antibodies persist for long periods. There was no association between the presence of positive serology for *Toxocara* spp. and asthma.

Keywords: Asthma. Incidence. Persistence. Risk factors. Seroprevalence. Toxocaríase.

5.1 INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma doença de distribuição mundial que afeta todas as idades, sendo mais vulneráveis as crianças em idade escolar. Esta doença é causada por larvas de nematódeos do gênero *Toxocara*. As espécies causais principais são *T. canis* e *T. cati*, parasitos intestinais de cães e gatos, respectivamente, sendo o homem um hospedeiro paratênico e a doença uma zoonose negligenciada (DESPOMMIER, 2003).

Os quadros clínicos da toxocaríase depende da carga parasitária, dos locais para quais o parasito migra e da resposta imune do hospedeiro. Os quadros clínicos reportados são: Larva Migrans Visceral (LVM), Larva Migrans Ocular (LMO), toxocaríase neurológica (NT) e toxocaríase assintomática (AHN *et al.*, 2014; MACPHERSON, 2013; ROLDÁN *et al.*, 2010).

O homem se infecta pela ingestão de ovos e é um hospedeiro paratênico, e a larva não completa seu ciclo, migrando pelos órgãos e sistemas por longos períodos, até mesmo anos, excretando e secretando antígenos que imunomodulam o hospedeiro e induzem a produção de anticorpos que persistem por longos períodos (MAIZELS, 2013).

Estudos epidemiológicos mostram que ter cães e gatos em casa é um fator de risco para adquirir a doença (MENDONÇA *et al.*, 2013). Além disso, existem relatos que não há associação com ter animais em casa, e a infecção pode ser adquirida em praças, parques, areias, solos contaminados ou por outra via, como alimentos como carnes pouco cozidas que contêm larvas de *Toxocara* spp. As crianças pequenas são as mais susceptíveis à infecção, porque brincam mais com os animais, além de terem maus hábitos higiênicos (CHOI *et al.*, 2012; FIALHO; CORREA, 2016; MANINI *et al.*, 2012). A toxocaríase tem uma distribuição cosmopolita com uma prevalência maior em países em desenvolvimento da América, África e Ásia de clima tropical ou subtropical. Na América Latina a soroprevalência de *Toxocara* spp. varia de 28,8 a 62,3% (MOREIRA *et al.*, 2014). Em estudos epidemiológicos realizados no Brasil, a soroprevalência variou de 8,7% a 65,4%;(COLLI *et al.*, 2010; CORREA, C. R. S.; BISMARCK, 2010; FRAGOSO *et al.*, 2011; MATTIA *et al.*, 2012; MENDONÇA *et al.*, 2013; NEGRI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2011). No Equador, existem poucos estudos sobre a prevalência de *Toxocara* spp. Em um trabalho realizado em Quito, a soroprevalência foi de 30% (TORRES; LOPEZ, 2004).

O método mais comumente utilizado para determinar anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. é o ELISA indireto, utilizando como antígenos fatores excretados/secretados por larvas

do *T. canis* (DE SAVIGNY; TIZARD, 1977). Entretanto essa técnica não classifica se a infecção é recente ou tardia. Existem estudos clínicos usando a ELISA de avidéz, e uma técnica que ajuda a diferenciar infecção recente e crônica, mostrando que alta avidéz indica infecção crônica e a baixa avidéz indica infecção recente. Porém estas técnicas têm suas limitações, pois não confirmam uma infecção recente (DZIEMIAN *et al.*, 2008; MENDONÇA *et al.*, 2013). Outra limitação desta técnica é que ela é uma espécie específica, a qual não se pode discernir qual a espécie de *Toxocara* envolvida na infecção (MENDONÇA *et al.*, 2013).

As infecções parasitárias helmínticas transmitidas através do solo afetam 2 bilhões da população mundial, sendo os helmintos mais prevalentes *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura*. Essas infecções são mais prevalentes em lugares com pouco saneamento e onde o abastecimento de água é limitado (ZIEGELBAUER *et al.*, 2012). Hoje com a melhoria das condições de saneamento no Brasil estas infecções são menos prevalentes (BARRETO, M. *et al.*, 2010). Assim a toxocaríase que não sofre a influência de saneamento, se tornou a infecção por geohelminto mais frequente em prevalência e distribuição mundial (MACPHERSON, 2013).

Estudos mostram que infecções por helmintos se associa com menos doenças alérgicas, principalmente nas infecções crônicas devido a imunomodulação causada por estes parasitos (ALCÂNTARA-NEVES, N. *et al.*, 2014; MAIZELS, 2005). Entretanto alguns relatos em crianças, mostraram que as infecções por *Toxocara* spp. podem aumentar as doenças alérgicas (KANOBANA *et al.*, 2013; PINELLI, E; ARANZAMENDI, 2012). Outros mostraram ausência da associação dessa infecção com alergia e asma (SHARGHI *et al.*, 2001). Um estudo do nosso grupo mostrou que a soropositividade para *Toxocara* spp. se associou com menos hiper-reatividade cutânea, com mais IgE anti-alérgenos, mas não se associou com asma (MENDONÇA *et al.*, 2012).

Diante das controvérsias relatadas, propomos neste estudo investigar os fatores de risco de aquisição da infecção por *Toxocara* spp. Além disso, temos o interesse em estudar a cinética, da infecção em longo prazo no ser humano, e uma possível associação da infecção com manifestações alérgicas, como a atopia e asma, em uma população de crianças de um estudo de coorte desde o nascimento na cidade de Quinindé, na província de Esmeraldas, Equador.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 População do estudo

A população da análise pertence a um estudo prospectivo desde o nascimento chamado ECUAVIDA, que é formado por 2.404 recém-nascidos que foram recrutados no Hospital Pedro Alberto Buffoni do distrito de Quinindé, na província de Esmeraldas, no Equador. Eles foram recrutados durante o período de novembro de 2005 a dezembro de 2009 e o Projeto permanece em andamento. Os critérios de elegibilidade foram os seguintes: (1) bebê saudável com idade inferior a 14 dias; (2) coleta de amostra de fezes da mãe; (3) a mãe ter 17 anos ou mais; (4) família residente no distrito de Quinindé por pelo menos dois anos com planos de permanecer por mais pelo menos três anos. A área de estudo tem um clima tropical, a temperatura média anual de 30°C e umidade relativa de 75%; altitude de até 200 m. Quinindé é composto por uma população com aproximadamente 150 mil habitantes que vivem em três cidades e seis povoados rurais. Sua economia é baseada em atividades agrícolas, principalmente do cultivo de palma africana, com acesso limitado a água potável, saneamento e serviços básicos.

5.2.1.1 Consentimentos e questionários

Os pais ou responsáveis das crianças assinaram um termo de consentimento informado. O protocolo foi aprovado pelos comitês de ética do Hospital Pedro Vicente Maldonado, Universidade San Francisco de Quito e Pontifícia Universidade Católica do Equador. O estudo está registrado como um estudo observacional (ISRCTN41239086). O termo de consentimento incluiu autorizar e responder um questionário epidemiológico e a análise de amostras de sangue das crianças coletadas nas diferentes idades.

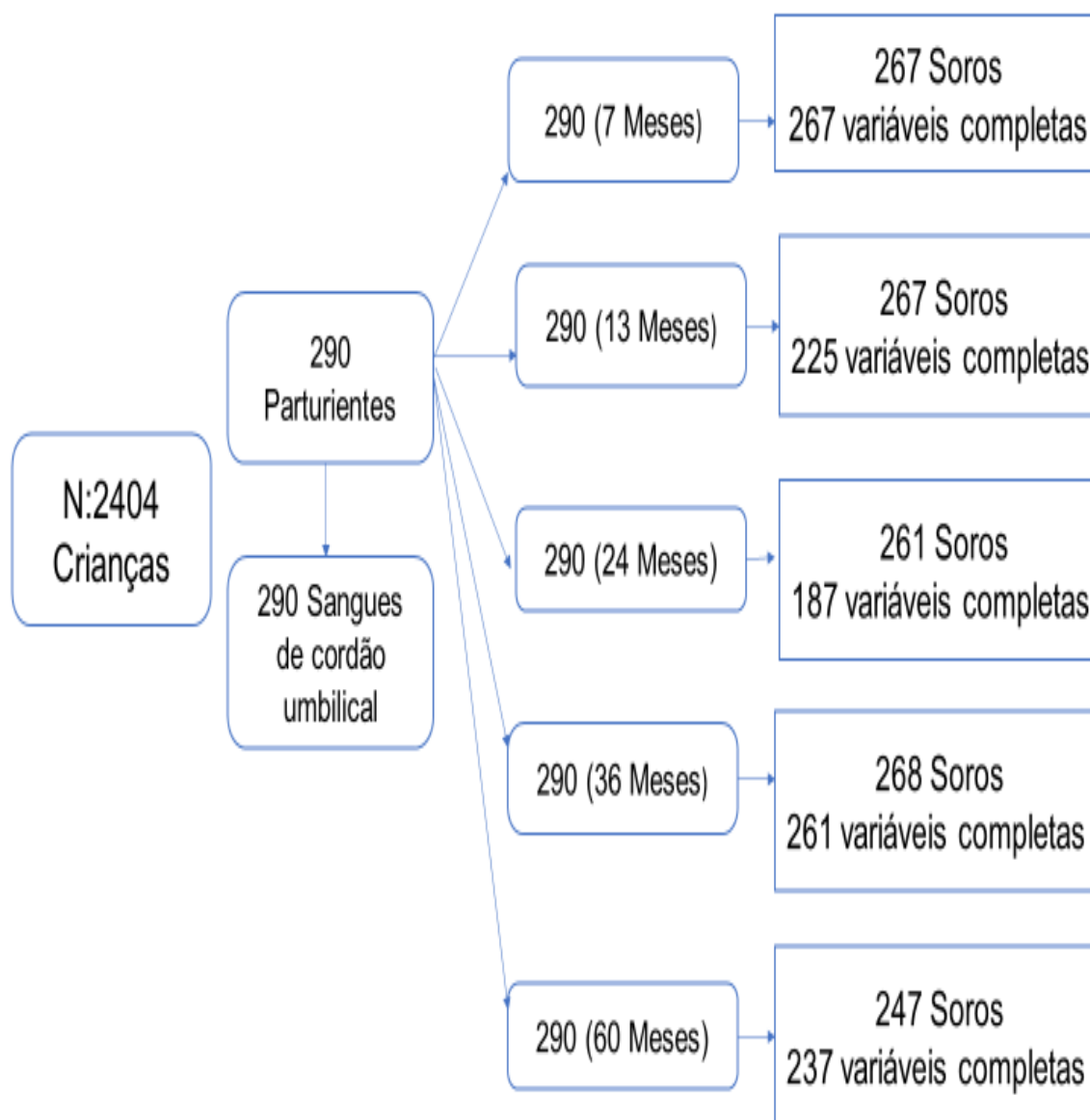
As mães responderam a um questionário sobre dados demográficos, socioeconômicos e características do agregado familiar, além de suas histórias obstétricas. Após o nascimento das crianças, foi administrado um questionário em espanhol com base no questionário da Fase II do International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) para coletar

informações sobre os fatores sócio-demográficos, alergia e sintomas de asma. Os questionários foram realizados 7, 13, 24, 36 e 60 meses após o nascimento das crianças.

5.2.1.2 Participantes do estudo

Foram estudadas crianças com as seguintes idades: 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade. (Figura 1 do fluxograma).

Figura 1 – Fluxograma da seleção da população estudada.



5.2.2 Definições de sibilância e atopia

Os dados foram coletados por meio de questionários. A sibilância recente foi definido como pelo menos um episódio de sibilos nos últimos 12 meses. Foram considerados atópicos, todas as crianças que tiveram o SPT com resposta positiva e pelo menos um alérgeno.

5.2.3 Testes de punctura cutânea

A sensibilização alérgica foi medida nas crianças de 60 meses de idade usando testes cutâneos com extratos de nove alérgenos (Greer Laboratories, Nuway Cir Lenoir, CN EUA) 1) ácaros (HDM; *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*); 2) barata americana (*Periplaneta americana*); 3) pelo de gato; 4) pelo de cães; 5) pólen de gramíneas (mistura de grama); 6) fungos (novo mix do estoque de fungos); 7) ovo; 8) leite; 9) amendoim. Solução salina e histamina foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. A reação foi observada depois de 15 minutos da aplicação dos alérgenos. O teste foi considerado positivo quando o diâmetro da pápula apresentou 2 mm a mais do que o valor do controle negativo.

5.2.4 Amostras sanguíneas

Três mL de sangue foram coletados de cada criança nos diferentes períodos de 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade em tubos de plástico (BD Vacutainer, Plymouth, UK), contendo heparina de sódio como anticoagulante. Após contagem de eosinófilos, os tubos de sangue foram centrifugados a 2.500 rpm por 10 minutos e o plasma foi transferido para tubos tipo Eppendorf, devidamente etiquetados e mantidos em temperatura -20°C até a realização dos ensaios de ELISA para a determinação de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp.

5.2.5 Amostras de fezes

As amostras de fezes para diagnosticar infecções por helmintos intestinais foram coletadas nas diferentes idades 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade. Essas amostras foram examinadas utilizando uma combinação de métodos, incluindo, exame direto de solução salina, o método de Kato-Katz (KATZ; CHAVES; PELLEGRINO, 1972) e o método de concentração de formol e acetato de etila (YOUNG *et al.*, 1979). Uma amostra positiva foi definida pela presença de pelo menos um ovo em pelo menos um métodos de detecção.

5.2.6 Obtenções do antígeno excretório/secretório de larvas de *Toxocara canis*

O antígeno TES foi preparado pelo método descrito por DE SAVIGNY (1975), adaptado por Alcântara-Neves e colaboradores (ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.*, 2008). Os vermes adultos fêmeas de *Toxocara canis* foram obtidos de filhotes após o tratamento com piperazina (180 mg/kg **p.c.**). Os ovos foram incubados numa solução de formalina a 2%, a 28°C e aerada diariamente durante 30 dias, até embrionamento posteriormente, a eclosão dos ovos foi induzida, com hipoclorito de sódio à 5% e as larvas foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ em meio RPMI-1640 suplementado com gentamicina (0,2mg/ml) e anfotericina (2,5 ug/ml). A cada quatro dias, as larvas foram recuperadas e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 24°C; o sobrenadante contendo TES foi recolhido e adicionado inibidor de protease (Fluoreto de fenilmesulfonamida (PMSF; Sigma, St. Louis, MO, EUA). A concentração do antígeno foi realizada em câmara fria a 4°C com filtro Amicon (Miliporecorporate, MA, USA) com membrana permissiva para moléculas menores de 3000 KD). Em seguida, o antígeno foi dialisado contra uma solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS). A determinação da concentração de proteína foi realizada utilizando o método de Folin Wu (Lowry *et al.* 1951).

Figura 2 – Obtenção do antígeno excretório/secretório de *T. canis*. A) Vermifugação de cães; B) Fêmeas grávidas de *T. canis*; C) Fixação e dissecação; D) Úteros dissecados; E) Ovos de *T. canis* incubados em formol sob visualização; F) Eclosão dos ovos de *T. canis*; G) Separação das larvas. H) Cultura das larvas com RPMI; I) concentração do Ag TES; J) Dialise do antígeno excretado/secretado.



5.2.7 Depleção de IgG reativas à antígenos de *Ascaris lumbricoides* dos soros estudados

Os anticorpos IgG anti-*Ascaris lumbricoides* que reagem cruzado com antígeno de *T. canis* foram absorvidos dos soros após incubação com antígeno somático de *A. lumbricoides*. Para tal, os soros foram diluídos em tampão de fosfato de sódio, 0,150 M, pH 7,4 (PBS) contendo polietilenoglicol PEG 15.000 15% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) e 0,1% de azida (Sigma Chemical Co. San Louis, MO, EUA). Em seguida os soros foram homogeneizados por 30 minutos a 4°C e centrifugados a 8.500 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi retirado livre de IgG anti-*A. lumbricoides*.

5.2.8 Ensaios imunes enzimáticos

Microplacas de polietileno de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno excretório e secretório das larvas do *Toxocara canis* (TES) na concentração de 3.5 µg/ml, diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (100µl/poço) e incubadas *overnight* a 4°C. Os locais de ligação livres foram bloqueados com 10% de solução de soro fetal bovino diluído em PBS/Tween-20 (SIGMA, San Louis, MO, USA) a 0,05% (PBS-T), por um período de uma hora. Os soros foram diluídos a 1:1.000 em PBS/T contendo 2,5 % de soro fetal bovino (GIBCO, América do Sul, Brasil) (PBS/T/SBF) e foi adicionado 100µl por poço.

Após incubação e lavagens foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humano biotilado (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), diluído a 1/2.000 em PBS/T/SFB e as placas foram incubadas. A revelação da reação foi feita com *streptavidina-peroxidase* (Pharmigen San Diego, CA, USA), diluída a 1/1.000 em PBS/T/SFB 2,5 seguidas após incubação e lavagens seguido pela adição do cromógeno (OPD, ortofenilenodiamina), (Sigma Chemical Co. San Louis, MO, USA) na concentração de 0,05 mg/ml; a reação de parada com 25µl de H₂SO₄, 2 N e lida utilizando em leitor de ELISA, usando um comprimento de onda de 450 nm. Todas as incubações foram realizadas à temperatura ambiente por 60 minutos com exceção do cromógeno que foi incubado por 30 minutos.

O ponto de corte do ensaio (DO=0,273) foi calculado como a média da densidade óptica, mais três desvios padrões das DOs dos soros de 10 mães e de crianças com menos de 2% de eosinófilos no sangue, com exames parasitológicos de fezes negativos e ausência de contato com cães e gatos. Para determinar a avidéz de ligação dos anticorpos ao antígeno,

depois da incubação dos soros, uma duplicata do cada soro foi tratada com ureia 6 M (Ureia Sigma Chemical Co. San Louis, MO, USA) diluída em PBS-T por um período de 10 minutos, e em seguida, o ensaio foi continuado como referido acima. Para determinar o índice de avidéz de IgG anti-*Toxocara* spp., foi usado o cálculo para índice de avidéz relativa: percentagem de redução (PR) = 100 - D.O. soros com ureia x 100/D.O. dos soros sem ureia. Um soro foi considerado de baixa avidéz, quando o PR foi menor que 50% (DZIEMIAN *et al.*, 2008).

5.2.9 Análise estatística

Na análise foram incluídas crianças que participaram do projeto desde os 7, 13, 24, 36 e 60 meses por separado com suas respectivas variáveis para cada idade e que tinham dados completos. A incidência foi calculada para analisar os casos novos de infecção por *Toxocara* spp. Esta foi medida com umas análises de frequências. As seguintes variáveis foram estudadas como fatores de risco para a aquisição da infecção por *Toxocara* spp.: se a criança frequentava creches, escolaridade materna, presença de cães ou gatos em casa e infecções helmínticas, nas diferentes idades. Foi utilizada análise logística, tendo a razão de chance com intervalo de confiança ao nível de 95%, tanto na análise bivariada quanto na análise multivariada. As variáveis com significância estatística menor que 20% na análise bivariada de cada grupo de idade por separado foram acrescentadas ao modelo multivariado.

Na análise para a associação entre *Toxocara* spp. (exposição) e os resultados de eosinofilia, sibilo, rinitis, SPT ácaro, SPT a qualquer alérgeno foram realizadas análises univariadas e multivariadas, utilizando regressão logística. Em todos os modelos estatísticos, as seguintes variáveis foram consideradas possíveis fatores de confusão: gênero, escolaridade materna, e infecção intestinal por helmintos. As análises foram realizadas no *software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 19.0.

5.3 RESULTADOS

Foram estudadas crianças que pertencem a um estudo de coorte desde o nascimento. Aos 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade foram determinadas a soroprevalência, incidência dos anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. nas diferentes faixas etárias além de associar estes resultados com fatores de risco para a infecção por este parasito. Além disso, foram

investigadas possíveis associações da soropositividade para *Toxocara* spp. com atopia e asma. A prevalência da soropositividade dos anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. nas diferentes faixas etárias estudadas foram de: 0,0% aos 7 meses; 9,3% aos 13 meses; aos 24 meses a prevalência foi de 48,4%; aos 36 meses foi de 64,9%; e aos 60 meses foi de 80,9%. (Figura 3).

Figura 3: Prevalência de anticorpos IgG anti - *Toxocara* spp., em soros de crianças 7 a 60 meses com e sem ureia.

A)

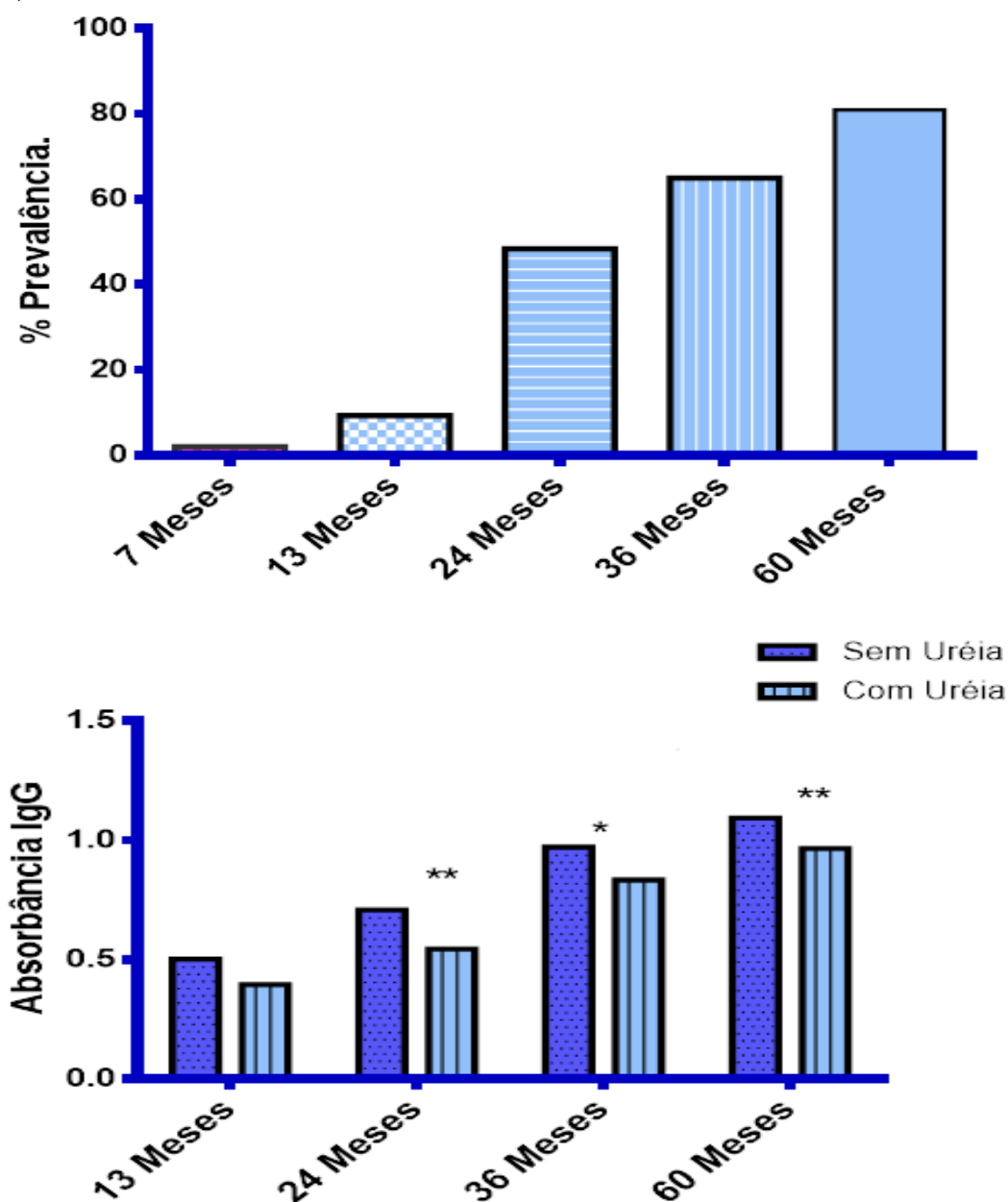


Figura 3 A) Soroprevalência de anticorpos IgG anti - *Toxocara* spp. de crianças de sete a 60 meses; B) medianas das densidades ópticas dos soros das crianças soropositivas, antes e após tratamento com ureia. *p < 0.05; ** p < 0.01, teste de Mann Whitney.

A maioria das infecções detectadas ocorreram de forma crônica, uma vez que baixa avididade foi encontrada apenas em soros de três crianças, uma com 13 meses e duas com 60 meses (Figura 4).

Figura 4- Índice de avididade de IgG anti – *Toxocara* spp. em soro de crianças de 13 até 60 meses

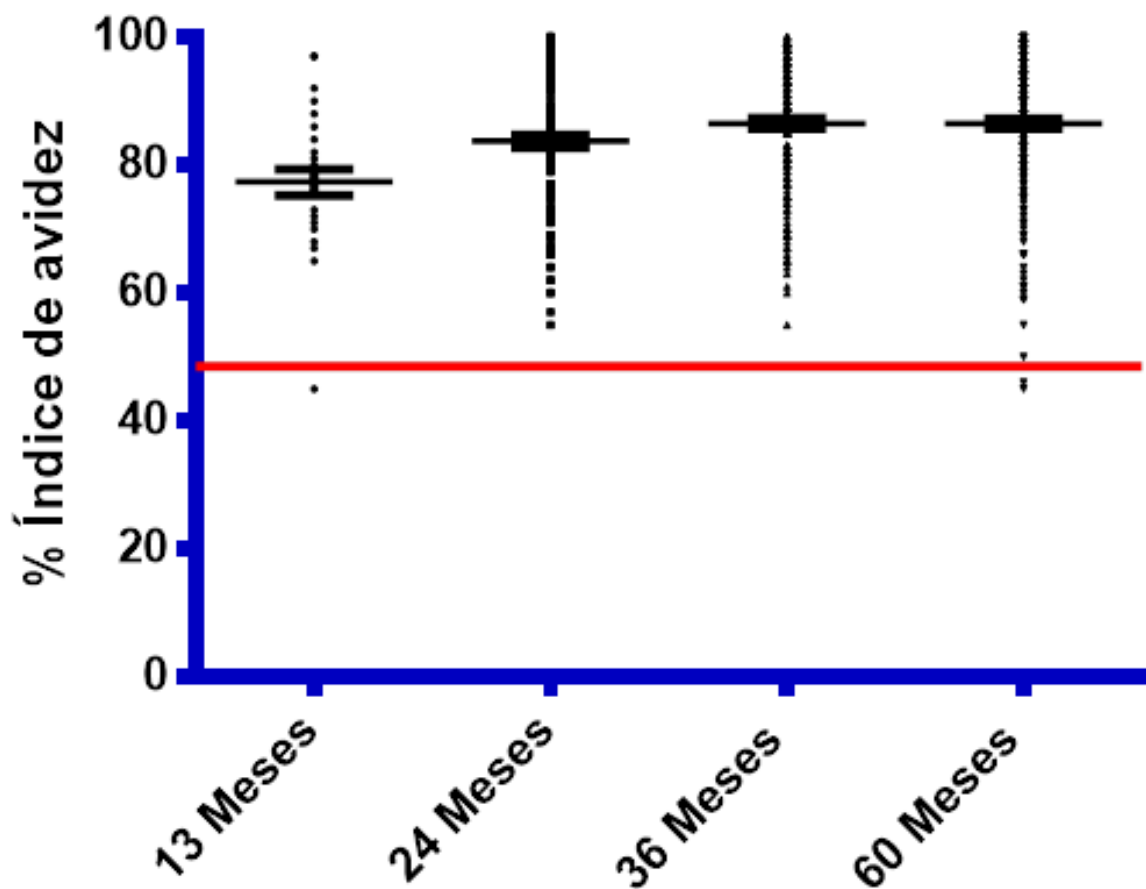
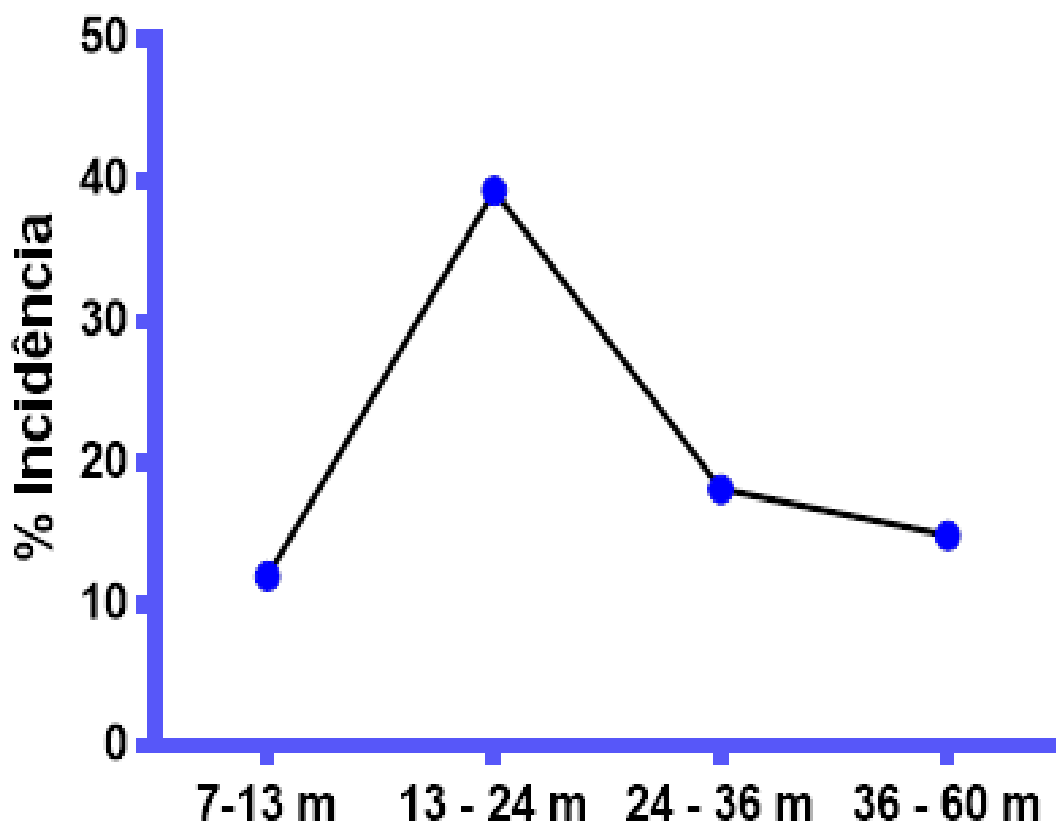


Figura 4- Índice de avididade de IgG anti – *Toxocara* spp. em soro de crianças de 13 até 60 meses; linha indica o índice avididade: 50 % ou mais indica infecção crônica. As barras horizontais indicam a mediana.

As incidências por grupo de idade analisadas foram: 10,3 % aos 13 meses; 36,2% aos 24 meses; 19,3% aos 36 meses; 15,2% aos 60 meses (**Figura 5**).

Figura 5. Incidência de IgG anti - *Toxocara* spp., em crianças de 7, 13, 24, 36 e 60 meses de idade.



Das 267 crianças estudadas aos 13 meses de idade, 225 com dados completos participaram da análise; das 21 crianças soropositivas, 12 (10,9 %) eram de sexo masculino e 9 (7,8%) de sexo feminino; 12 (8,3%) das mães estudaram até a escola primária; 19 das crianças (12,3%) tinham presença de cães em casa; 7 (10,1%) tinham gato; e 3 (13,6%) tinham infecção por helmintos e 3 (16,7%) frequentavam a creche. Para analisar a associação entre as variáveis mencionadas e o *Toxocara* spp., utilizou-se análises univariada e multivariada. Apenas a presença de cães em casa se associou positivamente ($OR_{Ajustada} = 5,16$

95 % CI=1,16-23,08) com a soropositividade para *Toxocara* spp. nas crianças quando tinham 13 meses. (**Tabela 1**).

Aos 24 meses, foram analisadas 261 crianças dos quais 187 que tinham dados completos participaram da análise; das 90 crianças soropositivas, 49 eram do sexo feminino (47,1%) e 41 do sexo masculino (49,4%); quanto ao nível de educação das mães das crianças infectadas, 16 (40%) estudaram a escola secundária, 61 (51,3%) estudaram até a primária e 13 (46,4) eram mães analfabetas. Setenta e um crianças (53%) tinham cães em casa; 40 (56,3%) tinham gatos; 22 (64,7%) infecções por helmintos e 11 (50,2%) frequentavam creche. Essas crianças tiveram como fator de risco de serem soropositivos para toxocaríase, ter cães em casa (OR_{Ajustada}= 2,03 95% CI =1,02 - 4,04) e infecção por helmintos intestinais (OR_{Ajustada} = 2,40 95 % CI=1.08 - 5,37) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti-*Toxocara* spp. em crianças de 13 e 24 meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador no período de 2009 e 2014

Fatores de risco	N	IgG anti- <i>Toxocara</i> spp.		OR Bruta (IC 95%)	OR Ajustada (IC 95%)
		Positivo n (%)	Negativo n (%)		
13 Meses	n= 225	21 (9,3)	204 (90,7)		
Sexo da criança					
Feminino	115 (51,1)	9 (7,8)	106 (92,2)	1	
Masculino	110 (48,9)	12 (10,9)	98 (89,1)	1,44 (0,58 - 3,57)	***
Educação materna					
Secundária	44 (19,6)	3 (6,8)	41 (93,2)	1	1
Primária	144 (64,0)	12 (8,3)	132 (91,7)	0,73 (0,29 - 1,81)	1,29 (0,34 - 4,86)
Analfabeto	37 (16,4)	6 (16,2)	31 (83,8)	2,23 (0,80 - 6,20)	3,10 (0,70 - 13,72)
Presença de cães em casa					
Não	70 (31,1)	2 (2,9)	68 (97,1)	1	1
Sim	155 (68,9)	19 (12,3)	136 (87,7)	4,75 (1,07 - 20,9)	5,16 (1,16 - 23,08)
Presença de gato em casa					
Não	156 (69,3)	14 (9,0)	142 (91,0)	1	
Sim	69 (30,7)	7 (10,1)	62 (89,9)	1,14 (0,44 - 2,98)	***
*Infecção por helmintos					
Não	203 (90,2)	18 (8,9)	185 (91,1)	1	
Sim	22 (9,8)	3 (13,6)	19 (86,4)	1,62 (0,44 - 6,02)	***
Creche					
Não	207 (92,0)	18 (8,7)	189 (91,3)		
Sim	18 (8,0)	3(16,7)	15 (83,3)	2,10 (0,55 - 7,94)	***
24 Meses	n = 187	91 (48,4)	97 (51,6)	OR bruta (IC 95%)	OR ajustada (IC 95%)
Sexo da criança					
Feminino	104 (55,6)	49 (47,1)	55 (52,9)	1	
Masculino	83 (44,4)	41 (49,4)	42 (50,6)	1,10 (0,61 - 1,95)	***
Educação materna					
Secundária	40 (21,4)	16 (40,0)	24 (60,0)	1	
Primária	119 (63,6)	61 (51,3)	58 (48,7)	1,41 (0,78 - 2,58)	***
Analfabeto	28 (15,0)	13 (46,4)	15 (53,6)	0,92 (0,41 - 2,06)	
Presença de cães em casa					
Não	53 (28,3)	19 (35,8)	34 (64,2)	1	1
Sim	134 (71,7)	71 (53,0)	63 (47,0)	2,02 (1,05 - 3,89)	2,03 (1,02 - 4,04)
Presença de gato em casa					
Não	116 (62,0)	50 (43,1)	66 (56,9)	1	1
Sim	71 (38,0)	40 (56,3)	31 (43,7)	1,70 (0,94 - 3,09)	1,42 (0,76 - 2,64)
*Infecção por helmintos					
Não	153 (81,8)	68 (44,4)	85 (55,6)	1	1
Sim	34 (18,2)	22 (64,7)	12 (35,3)	2,29 (1,06 - 4,96)	2,40 (1,08 - 5,37)
Frequente creche					
Não	165 (88,2)	79 (47,9)	86 (52,1)	1	***
Sim	22 (11,8)	11 (50,2)	11 (50,0)	1,09 (0,45 - 2,65)	

*** Variáveis excluídas do modelo multivariado com um valor de p superior a 0,20

** Ajustadas pôr a variável significativa em cada idade.

* Análise realizada com crianças que tinham todas as variáveis.

Aos 36 meses foram estudadas 268 crianças, sendo analisadas 261 delas que tinham dados completos. Destas 169 eram soropositivas para *Toxocara* spp., sendo 87 (71,3%) do sexo masculino; 102 (62,6%) das mães estudaram até a escola primária; 140 (67,0%) tinham presença de cães em casa; 91 (74,6%) tinham gato em casa; 49 (76,6%), estavam infectadas por helmintos; 27 (69,2%) frequentavam creches. Os seguintes fatores de risco para adquirir a infecção por *Toxocara* spp: como ser do sexo masculino (OR_{Ajustada} = 1,70 95 % IC = 1,00-2,93), presença gatos em casa (OR_{Ajustada}= 2,24 95 % IC = 1,28-3,93). A variável infecção por helmintos se mostrou borderline (OR_{Ajustada}= 1,85 95 % IC = 0,99 - 3,62) (**Tabela 2**).

Aos 60 meses, foram estudadas 247 crianças; dentre as quais, 237 tinham dados completos para a análise, sendo que dentro desta amostra, 191 foram soropositivas e 95 (85,6%) eram do sexo masculino; 126 (82,9%) as mães estudaram até a escola primária; 174 (81,7%) tinham cães em casa; 154 (82,4 %) tinham presença de gato em casa; e 49 (90,7%) tinham alguma infecção por helmintos. As análises multivariadas nas crianças de sexo masculino e infecção por helmintos demonstraram uma associação positiva borderline (OR_{Ajustada} = 1,88 95% IC = 0,95-3,70); (OR_{Ajustada} = 2,62 95% IC = 0,97-7,08) respectivamente (**Tabela 2**).

Tabela 2. Frequência das variáveis estudadas e suas associações com soropositividade de IgG anti-*Toxocara* spp. em crianças de 36 e 60 meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé - Equador no período de 2009 e 2014

Conclusão

Fatores de risco	N	IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. Positivo n (%)	Negativo n (%)	OR Bruta (IC 95%)	OR Ajustada (IC 95%)
36 Meses	n= 261	169 (64,8)	92 (35,2)		
Sexo da criança					
Feminino	139 (53,3)	82 (59,0)	57 (41,0)	1	1
Masculino	122 (46,7)	87 (71,3)	35 (28,7)	1,73 (1,03 - 2,90)	1,70 (1,00 - 2,93)
Educação materna					
Secundária	51 (19,5)	32 (62,7)	19 (37,3)	1	1
Primária	163 (62,5)	102 (62,6)	61 (37,4)	0,77 (0,45 - 1,31)	0,85 (0,43 - 1,68)
Analfabeto	47 (18,0)	35 (74,5)	12 (25,5)	1,74 (0,85 - 3,55)	1,52 (0,61 - 3,77)
Presença de cães em casa					
Não	52(19,9)	29 (55,8)	23 (44,2)	1	1
Sim	209(80,1)	140 (67,0)	69 (33,0)	1,61(0,87 - 2,99)	1,11 (0,57 - 2,16)
Presença de gato em casa					
Não	139 (53,3)	78 (56,1)	61 (43,9)	1	1
Sim	122 (46,7)	91 (74,6)	31 (25,4)	2,20 (1,35 - 3,90)	2,24(1,28 - 3,93)
*Infecção por helmintos					
Não	197 (75,5)	120 (60,9)	77 (39,1)	1	1
Sim	64 (24,5)	49 (76,6)	15 (23,4)	2,10 (1,10 - 4,00)	1,85 (0,99 - 3,62)
Creche					
Não	222 (85,1)	142 (64,0)	80 (36,0)		
Sim	39 (14,9)	27 (69,2)	12 (30,8)	1,27 (0,61 - 2,64)	***
60 Meses	n = 237	191 (80,6)	46 (19,4)	OR bruta (IC 95%)	OR ajustada (IC 95%)
Sexo da criança					
Feminino	126 (53,2)	96 (76,2)	30 (23,8)	1	1
Masculino	111 (46,8)	95 (85,6)	16 (14,4)	1,85 (0,95 - 3,63)	1,88 (0,95 - 3,70)
Educação materna					
Secundária	45 (19,0)	31 (68,9)	14 (31,1)	1	
Primária	152 (64,1)	126 (82,9)	26 (17,1)	1,50 (0,77 - 2,87)	***
Analfabeto	40 (16,9)	34 (85,0)	6 (15,0)	1,44 (0,57 - 3,68)	***
Presença de cães em casa					
Não	24 (10,1)	17 (70,8)	7 (29,2)	1	
Sim	213 (89,9)	174 (81,7)	39 (18,3)	1,84 (0,71 - 4,73)	***
Presença de gato em casa					
Não	50 (21,1)	37 (74,0)	13 (26,0)	1	1
Sim	187 (78,9)	154 (82,4)	33 (17,6)	1,64 (0,79 - 3,42)	1,58 (0,74 - 3,36)
*Infecção por helmintos					
Não	183 (77,2)	142 (77,6)	41 (22,4)	1	1
Sim	54 (22,8)	49 (90,7)	5 (9,3)	2,83 (1,06 - 7,57)	2,62 (0,97 - 7,08)

*** Variáveis excluídas do modelo multivariado com um valor de p superior a 0,20

** Ajustadas pôr a variável significativa em cada idade.

* Análise realizada com crianças que tinham todas as variáveis.

Os resultados da associação da soropositividade para IgG anti-*Toxocara* spp. com eosinofilia nas diferentes idades estão mostrados na **tabela 3**. Nas crianças de 13 meses houve uma associação positiva, porém sem significância estatística (OR Ajustada 2,53 CI = 0,81- 7,88). Nas crianças de 24, 36 e 60 meses houveram associações positivas estatisticamente significantes (OR Ajustada = 4,31 95 % CI = 2,19-8,47; OR Ajustada = 3,13 95% IC= 1,75-5,59; e OR Ajustada = 3,08(1,51-6,23) respectivamente.

Tabela 3 – Associação da infecção por *Toxocara* spp. com eosinofília em crianças de 13, 24, 36 e 60 meses de idade de um estudo do coorte no município de Quinindé – Equador.

*OR Ajustada com as seguintes variáveis: sexo, escolaridade materna, presença de helminto

<i>Toxocara</i>	N	Eosinofilia			
		$\geq 5\%$	$< 5\%$	OR univariada (IC 95 %)	OR multivariada (IC 95%)
13 Meses	N=225	30 (13,3)	195 (86,7)		
Negativo	204 (90,7)	25 (12,3)	179 (87,7)	1	
Positivo	21 (9,3)	5 (23,8)	16 (76,2)	2,24 (0,75-6,64)	2,53 (0,81- 7,88)
24 Meses	N=188	65 (34,6)	123 (65,4)		
Negativo	97 (53,6)	19 (19,6)	78 (80,4)	1	1
Positivo	91 (48,4)	46 (50,5)	45 (49,5)	4,20 (2,19-8,02)	4,31 (2,19-8,47)
36 Meses	N=262	118 (45,0)	144 (55,0)		
Negativo	92 (35,1)	24 (26,1)	68 (47,2)	1	1
Positivo	170 (64,9)	94 (55,3)	76 (44,7)	3,50 (2,01-6,10)	3,13 (1,75-5,59)
60 Meses	N=240	128 (54,2)	108 (45,8)		
Negativo	45 (19,1)	15 (32,6)	31 (67,4)	1	1
Positivo	191 (80,9)	116 (59,8)	78 (40,2)	3,07 (1,57-6,07)	3,08(1,51 – 6,23)

Os resultados da análises de soropositividade de IgG anti-*Toxocara* spp. com atopia, rinite e sibilância, não demonstrou associação estatisticamente significante entre a soropositividade de IgG anti-*Toxocara* spp. e marcadores alérgicos nas crianças de 5 anos de idade.

Tabela 4 – Associação da infecção por *Toxocara* spp. com marcadores de atopia e alergia em crianças de cinco anos de um estudo do coorte no município de Quinindé – Equador

		Sibilo			
		Sim	Não	OR Univariada	*OR Multivariada
<i>Toxocara</i>	N=236	n (%)	n (%)	(IC 95%)	(IC 95%)
Negativo	45 (19,1)	10 (22,2)	35 (77,8)	1	1
Positivo	191 (80,9)	35 (18,3)	156 (81,7)	0,78 (0,35-1,73)	0,86 (0,38 - 1,98)
		Rinite			
<i>Toxocara</i>	N=236	Sim	Não	OR Univariada	*OR Multivariada
		41 (17,4)	194 (82,6)		
Negativo	45 (19,1)	11 (24,4)	34 (75,6)	1	1
Positivo	191 (80,9)	30 (15,7)	160 (84,3)	0,58 (0,26-1,26)	0,46 (0,20 -1,07)
		SPT acaro			
<i>Toxocara</i>	N=236	≥ 3 mm	< 3 mm	OR Univariada	*OR Multivariada
		31 (13,1)	205 (86,9)		
Negativo	45 (19,1)	9 (20,0)	36 (80,0)	1	1
Positivo	191 (80,9)	22 (11,5)	169 (88,5)	0,52 (0,22-1,22)	0,53 (0,22-1,28)
		SPT qualquer alérgeno			
<i>Toxocara</i>	N=236	≥ 3 mm	< 3 mm	OR Univariada	*OR Multivariada
		50 (21,2)	186 (78,8)		
Negativo	45 (19,1)	10 (22,2)	35 (77,8)	1	1
Positivo	191 (80,9)	40 (20,9)	151 (79,1)	0,93 (0,42-2,03)	0,91(0,41-2,04)

*OR Ajustada com as seguintes variáveis: sexo, escolaridade materna, presença de helminto.

5.4 DISCUSSÃO

A prevalência em geral de *Toxocara* spp. nos seres humanos é influenciada por um grupo de variáveis que estão ligadas ao nível populacional, fatores ambientais, geográficos, culturais e socioeconômicos, além de idade e sexo.

Neste contexto, nossa população de estudo é de um distrito rural, em Quinindé, que pertence à cidade de Esmeraldas, no Equador. O clima do local é tropical, tem serviços básicos deficientes e a população predominantemente de nível socioeconômico baixo, o que poderia favorecer a ocorrência de diversos parasitos, inclusive *T. canis* e *T. cati*s.

T. canis e *T. cati*s afetam pessoas de diferentes idades, sendo que as crianças são o grupo etário com maior risco de infectar-se. Isto se deve ao fato delas brincarem em solos contaminados, onde contêm ovos embrionados do *Toxocara* spp., além de conviverem próximo a animais domésticos. Além disso, a falta de cuidados na higiene facilita a transmissão destes parasitos.

A população analisada neste estudo incluiu crianças participantes de um estudo de coorte longitudinal que acompanha estas crianças desde o nascimento. Foram analisadas 1.310 amostras de sangue de crianças em diferentes idades, aos 7, 13, 24, 36 e 60 meses. Observou-se que a soroprevalência encontrada na população foi de 0,0% para as crianças de 7 meses; 9,3 % nos de 13 meses; 48,4% nos de 24 meses; 64,9 % nos de 36 meses e de 80,9 % nas crianças de 60 meses.

Pode-se perceber que a soroprevalência foi alta, e similar a outros dados da literatura reportados em outros países em desenvolvimento com as mesmas características, como carência de saneamento e baixo nível socioeconômico.

Em um estudo realizado com crianças de seis meses a seis anos de idade em Santa Lúcia (ilha caribenha) a soroprevalência de *Toxocara* spp. foi de 86% (THOMPSON *et al.*, 1986). Em outro estudo feito por Fu e colaboradores (FU, C. *et al.*, 2014) em crianças de 7 a 12 anos nas Ilhas Marshall em Taiwan, encontrou-se uma soroprevalência de 86,75%. Na Indonésia foi relatada uma prevalência de 84,6 % (HAYASHI *et al.*, 2005). Um trabalho do nosso grupo (SILVA *et al.*, 2016), em crianças de uma cidade pequena no Nordeste do Brasil, encontrou-se uma soroprevalência de 63,5%. Corroborando com nossos dados, pode-se perceber que a prevalência de infecção por *Toxocara* spp., no Brasil é elevada, apesar de ser uma doença negligenciada e por ser assintomática passa frequentemente despercebida.

Observando os resultados da prevalência pode-se perceber que, à medida que a criança cresce, a soroprevalência aumenta, assim como a reatividade dos anticorpos anti-*Toxocara*, indicando que a soroprevalência poderia ser acumulativa nas crianças. Isto talvez ocorra porque os títulos de anticorpos anti-*Toxocara* spp., poderiam persistir com o passar do tempo e após a infecção, porque as larvas do parasito nos hospedeiros acidentais podem permanecer viáveis por longos períodos após a infecção ou então pela ocorrência de infecção sucessiva (WON *et al.*, 2008). Dados similares em algumas pesquisas mostram como se comporta os anticorpos IgG anti *Toxocara* ao longo do tempo. Em um estudo de pacientes clinicamente diagnosticados com toxocariase, acompanhados por um período de 5 anos, observou-se que as larvas podem sobreviver pelo menos 5 anos, indicando que a estimulação antigênica foi suficiente para manter elevados os níveis de anticorpos por anos (CHIEFFI *et al.*, 1995; FENOY *et al.*, 1992; LESCANO *et al.*, 2005).

Pesquisas feitas com estudos transversais encontraram aumento da prevalência com o passar da idade, mas não foram estatisticamente significante (LIAO *et al.*, 2010)(SMITH *et al.*, 2009). As crianças de nosso estudo começaram a se infectar aos 13 meses de idade. Uma das explicações para as crianças se infectarem nesta idade seria porque as mães costumam deixar as crianças no chão para que este comece a engatinhar, além disso, levam suas mãos sujas a boca, assim poderiam ingerir ovos embrionados e infectar-se com *Toxocara* spp., proveniente de animais domésticos.

A amostra estudada pertence a um estudo longitudinal desde o nascimento, permitindo uma melhor avaliação sobre a idade em que as crianças começam a se infectar-se. Comparando estes dados com outras pesquisas realizadas na Amazônia brasileira, observamos a estratificação da idade em três grupo etários: 12 a 35 meses e 29 dias, 36 a 71 meses e 29 dias, e acima de 72 meses, e não se encontrou relação estatisticamente significante entre os grupos de idade. A média etária de maior prevalência foi de 6 anos e meio (FIGUEIREDO, S. *et al.*, 2005). Uma outra possibilidade é que nesta região as crianças se infectam mais cedo e o 1º grupo, sendo de até 36 meses, não possibilitou observar a elevação da prevalência, a outra possibilidade é que até ao momento de estratificar por idades e não se observa a subida da prevalência.

Outro estudo feito na Amazônia, durante dois períodos diferentes do ano, encontrou que a faixa etária mais prevalente era a de crianças maiores de 60 meses (OLIART-GUZMÁN *et al.*, 2014). Nosso trabalho corrobora este estudo, uma vez que crianças de 60 meses de nossa população de estudo foram as mais soropositivas para *Toxocara* spp., com

uma prevalência de 80,1%; isto se deve provavelmente ao fato de que elas brincam com maior frequência em ambientes contaminados com ovos embrionados, justamente pelo fato de terem casas com quintal de terra e hábitos de geofagia. Considerando que os fatores como pobreza e falta de higiene levam a um risco maior de infectar-se (MACPHERSON, 2013; SCHOENARDIE, E. R. *et al.*, 2013). Outros estudos indicam que crianças com idade inferior a 10 anos são mais suscetíveis a ter infecção por *Toxocara* spp. (MANINI *et al.*, 2012).

A grande maioria dos estudos feitos para a pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxocara* são estudos transversais. Estes estudos não nos permitem ver o momento em que ocorre a infecção pelo *Toxocara* spp., nem ver a taxa de incidência da soropositividade.

Em um estudo feito em 138 moradores de três municípios de Campinas Brasil os participantes foram avaliados em dois anos consecutivos, para comparar a soropositividade de anticorpos anti-*Toxocara* spp. Entre os dois anos consecutivos da pesquisa, foi possível detectar uma taxa anual de incidência de 12 (17,9%), dos quais oito eram menores de 10 anos (ANARUMA FILHO *et al.*, 2003). Existem poucos estudos medindo a incidência de anticorpos anti-*Toxocara* spp. no decorrer dos anos.

Nosso estudo propõe detectar em que idade aparecem casos novos através de análises de incidência em diversas faixas etárias e na mesma mostra de estudo. Isto nos permitiu determinar a taxa de incidência da infecção do *Toxocara* spp. e analisarmos os fatores de risco para obtenção da infecção nas crianças aos 7, 24, 36 e 60 meses. Observamos que a taxa anual de incidência da infecção desse grupo de estudo foi maior aos entre os 13 e 24 meses (36,2%). Possivelmente devido à idade em que as crianças começam a brincar em lugares contaminados com ovos embrionados de *Toxocara* spp.

Existem poucos estudos na literatura sobre o comportamento e a persistência de anticorpos de *Toxocara* depois de uma infecção, este indicativo poderia ajudar a analisar se as altas prevalências de *Toxocara* spp. são causadas por anticorpos que persistem por longos períodos ou por causa das reinfecções (WON *et al.*, 2008).

A população estudada em diferentes períodos de idade nos permitiu analisar a persistência dos anticorpos IgG anti-*Toxocara* e os resultados observados foram que os anticorpos de *Toxocara* spp. persistem por longos períodos. Observou-se que as crianças aos 13 meses começam a infectar-se, os anticorpos continuam até os 5 anos de idade e a taxa de persistência mais alta por ano analisada foi de 45,9% no período de 24 a 60 meses. Além disso a medida que a criança cresce vai aumentando a concentração do anticorpo de forma ascendente. Estes dados concordam com pesquisas realizadas anteriormente por FENOY *et*

al., (1992), ao realizar um estudo clínico de toxocaríase em crianças por um período de 5 anos, que apresentaram níveis de imunoglobulinas anti-*Toxocara* elevados.

Sobre as análises de fatores de risco e *Toxocara* spp. quanto à variável sexo, há pesquisas que mostram que o sexo masculino é mais infectado. A causa mais frequente é devido ao hábito deles brincarem mais fora de casa favorecendo um maior contato com o solo contaminado de ovos embrionados comparado com as crianças do sexo feminino. Nosso estudo corrobora esses achados. Quando analisamos as crianças por faixas etárias, nas crianças de 36 meses encontrou-se uma associação positiva estatisticamente significativa na análise multivariada (OR_{ajustada} = 1,70 95% IC = 1,00-2,93) enquanto que na faixa etária de 60 meses, em ambas análises a associação positiva foi borderline (OR_{ajustada} = 1,88 95% IC = 0,95-3,70 e respectivamente).

Um fator de risco muito importante para a infecção causada por *Toxocara* spp. é o contato com cães e gatos nas casas, já que eles são as fontes da infecção (SCHNIEDER; LAABS; WELZ, 2011; STRUBE; HEUER; JANECEK, 2013). Estudos feitos em Salvador por nosso grupo demonstraram que o contato intradomiciliar com estes animais representam um risco para ter soropositividade para *Toxocara* spp. (MENDONÇA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2016).

Nesta pesquisa, utilizou-se a variável presença de cães e de gato, dentro ou fora das casas, e os resultados das análises mostram que ter contato com cães aos 13 meses mostrou uma associação significativa (OR_{ajustada} = 5,16 95% IC = 1,16-23,08), aos 24 meses também mostrou significância, mas na análise (OR_{ajustada} = 2,03; IC 1,02-4,04), aos 36 meses, não teve relação com cães, mas sim com presença de gato (OR = _{ajustada} 2,24 95 % IC = 1,28-3,93); e aos 60 meses não houve associação.

Podemos observar também neste estudo que existe uma associação significativa entre ter contato com gatos nas casas e a infecção por *Toxocara* spp., outros estudos encontram associação similar (FRAGOSO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2016).

Com estes resultados, podemos dizer que eles se infectaram pela presença de cães ou gato nas casas os quais eliminam ovos embrionados nos solos das casas facilitando a contaminação as crianças aos 13 meses, e nesta idade começaram a se infectar, a causa provavelmente foi ter esses dois animais de estimação em suas residências e uma outra possibilidade é que, com o passar os anos, as crianças já estiveram infectadas. Provavelmente, os anticorpos presentes nas idades das crianças restantes sejam por acumulação dos títulos dos

anticorpos de *Toxocara* spp. que poderiam persistir por um longo tempo, e por essa razão não observamos em todas as idades associação com as variáveis presença de cães ou gato.

Outra possibilidade de adquirir *Toxocara* spp. seria que as crianças que são maiores saem de casa e se infectam brincando nos parques, ou em nas ruas, casas de vizinhos etc. Além disso, ter contato com ovos embrionados presentes na pelagem dos cães seria outra forma de contágio e de transmissão, a criança poderia adquirir o *Toxocara* spp., desta forma, não é necessário ter o animal para poder se contagiar, tornando-se uma via de transmissão pouco usual, mas possível de acontecer conforme reportam algumas pesquisas. (AMARAL *et al.*, 2010)(EL-TRAS; HOLT; TAYEL, 2011).

As larvas de *Toxocara* spp. nos hospedeiros acidentais migram por alguns órgãos e causam respostas inflamatórias, uma destas respostas tem sido associada a uma elevada eosinofilia (FAN; LIAO; CHENG, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2012; PINELLI, E; ARANZAMENDI, 2012). Nas crianças estudadas em diferentes idades neste trabalho, observa-se que existe uma associação significativa na presença de anticorpos anti-*Toxocara* spp. com eosinofilia. Aos 24 meses, teve uma associação significante no modelo multivariado com uma OR ajustada = 4,31 95% IC = 2,19-8,47); aos 36 meses também, com uma OR ajustada = 3,13 95 % IC = 1,75-5,59) e aos 60 meses também, com uma OR ajustada = 3,08 95% IC = 1,51- 6,23).

Estes dados confirmam que a toxocaríase pode causar eosinofilia, como já mencionado em pesquisas anteriores (MENDONÇA *et al.*, 2012; ROLDÁN *et al.*, 2008). Isto se deve ao fato de que os helmintos suscitam a produção de eosinófilos. Os eosinófilos evoluíram como sistema de defesa específico contra os estágios teciduais de helmintos que por serem grandes não podem ser fagocitados por células do sistema fagocitário. Nos casos de toxocaríase a eosinofilia é devido ao aumento da atividade de linfócitos de perfil Th2 e diminuição daqueles de perfil Th1. A ação da interleucina 4 amplifica a produção de IgE e interleucina 5 facilita o crescimento e diferenciação de eosinófilos (BOJANICH; ALONSO; JOSÉ, 2006).

Quando analisamos a associação entre soropositividade para IgG anti-*Toxocara* spp. com a variável infecção por helmintos nas crianças, observamos que há associação positiva na análise univariada para todas as faixas etária, mas na análise multivariada há associação positiva e significativa (aos 24 meses) e borderline (aos 36 e 60 meses). Esta associação se explica devido a estes parasitos terem em modo de transmissão em comum como ser através de ovos, serem geohelmintos e ocorrerem em ambientes similares.

A escolaridade da mãe neste caso representa um marcador de pobreza e é um fator de risco independente para infecção por *Toxocara* spp. Nas crianças estudadas, não se encontrou associação com escolaridade da mãe, ou seja, ter terminado a escola secundária ou ter primária incompleta não influenciou. Independentemente deste fator, seus filhos se infectavam com *Toxocara* spp.

Na nossa amostra não foi encontrada associação significativa entre a presença de sorologia positiva para *Toxocara* spp. e um histórico de asma ou outras manifestações alérgicas, como atopia rinite e sibilância. Uma possibilidade seja devido a que a prevalência nessa idade é alta e dos marcadores de asma é pequena, alta prevalência encontrada dificultou as análises logísticas, diminuindo seu poder.

5.5 REFERÊNCIAS

AHN, S. *et al.* Clinical Features and Course of Ocular Toxocariasis in Adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 5–12, 2014.

ALCÂNTARA-NEVES, N. *et al.* Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 817, 2014.

ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.* An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 349–351, 2008.

AMARAL, H. *et al.* Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: A risk factor for Visceral Larva Migrants. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 115–118, 2010.

ANARUMA FILHO, F. *et al.* Human toxocariasis: Incidence among residents in the outskirts of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 293–294, 2003.

BARRETO, M. *et al.* Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 11, p. 1637–1642, 2010.

BOJANICH, M. D. L. A.; ALONSO, M. V; JOSÉ, M. Efecto de la exposición a *Toxocara canis* en pacientes con asma bronquial . **Universidad Nacional Del Nordeste**, 2006.

CHIEFFI, P. *et al.* Persistence of specific antibody response in different experimental infections of mice with *Toxocara canis* larvae. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 187–190, 1995.

CHOI, D. *et al.* Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: A cross-sectional study in healthy adults. **Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 23–27, 2012.

COLLI, C. *et al.* Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil [Avaliação sorológica, clínica e epidemiológica da toxocaríase em áreas urbanas do sul do Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 52, n. 2, p. 75–81, 2010.

CORREA, C. R. S.; BISMARCK, C. M. Toxocariasis: Incidence, Prevalence and the Time Serum remains Positive in School Children from Campinas, SP, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 56, n. 3, p. 215–216, 2010.

DE SAVIGNY, D. .; TIZARD, I. . Toxocaral larva migrants: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 501–507, jan. 1977.

DE SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrants. **The Journal of parasitology**, v. 61, n. 4, p. 781–2, 1975.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and Molecular Aspects Toxocariasis . **Society**, v. 16, n. 2, p. 265–272, 2003.

DZIEMIAN, E. *et al.* Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30 p. 187–190, 2008.

EL-TRAS, W.; HOLT, H.; TAYEL, A. Risk of Toxocara canis eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 319–323, 2011.

FAN, C. K.; LIAO, C. W.; CHENG, Y. C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 342–352, 2013.

FENOY, S. *et al.* Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 1037–1038, 1992.

FIALHO, P. M. M.; CORREA, C. R. S. A systematic review of toxocariasis: A neglected but high-prevalence disease in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1193–1199, 2016.

FIGUEIREDO, S. *et al.* Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 2, p. 126–132, 2005.

FRAGOSO, R. *et al.* Anti-Toxocara antibodies detected in children attending elementary school in Vitoria, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 461–466, 2011.

FU, C. *et al.* Seroepidemiology of Toxocara Canis infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 261, 15 dez. 2014.

HAYASHI, E. *et al.* The high prevalence of asymptomatic Toxocara infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1399–1406, 2005.

KANOBANA, K. *et al.* Toxocara seropositivity, atopy and asthma: A study in Cuban schoolchildren. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 4, p. 403–406, 2013.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple Devive for quantitativa stool Thick-smear technique in shistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397 - 400 Novembro, 1972.

LESCANO, S. *et al.* Anti-helmínticos na toxocaríase experimental: efeito na recuperação de larvas de Toxocara canis e na resposta humoral. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 1, p. 2–5, 2005.

LIAO, C. *et al.* Seroprevalence of Toxocara canis infection among children in Swaziland, southern Africa. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 104, n. 1, p. 73–80, 2010.

MACPHERSON, C. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A

zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 999–1008, 2013.

MAIZELS, R. M. Infections and allergy - Helminths, hygiene and host immune regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 6, p. 656–661, 2005.

MAIZELS, R. M. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 365–374, 2013.

MANINI, M. *et al.* Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 48–52, 2012.

MATTIA, S. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **Journal of helminthology**, v. 86, n. 4, p. 440–5, 2012.

MENDONÇA, L. *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Toxocara* infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 90–95, 2013.

MENDONÇA, L. *et al.* *Toxocara* Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1–9, 2012.

MOREIRA, G. *et al.* Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 456–464, 2014.

NEGRI, E. *et al.* Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: Serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 211–216, 2013.

OLIART-GUZMÁN, H. *et al.* Epidemiology and control of child toxocariasis in the Western Brazilian Amazon - A population-based study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 670–681, 2014.

PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. *Toxocara* infection and its Association with Allergic Manifestations. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 33–44, 2012.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Diagnóstico de la toxocarosis humana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 2010.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Frequency of eosinophilia and risk factors and their association with *Toxocara* infection in schoolchildren during a health survey in the North of Lima, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 273–278, 2008.

SCHNIEDER, T.; LAABS, E.; WELZ, C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 193–206, 2011.

SCHOENARDIE, E. R. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 537–539, 2013.

- SHARGHI, N. *et al.* Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, NULL, v. 32, n. 7, p. E111–E116, 2001.
- SILVA, M. *et al.* Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. *Acta Tropica*, p. 1–7, 2016.
- SMITH, H. *et al.* How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology*, v. 25, n. 4, p. 182–188, 2009.
- SOUZA, R. *et al.* [Prevalence and risk factors of human infection by *Toxocara canis* in Salvador, State of Bahia, Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 4, p. 516–519, 2011.
- STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*, v. 193, n. 4, p. 375–389, 2013.
- THOMPSON, D. E. *et al.* Edidemiological characteristics of *Toxocara canis* zoonotic infection of children in a Caribbean community. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 64, n. 2, p. 283–290, 1986.
- TORRES, H. E.; LOPEZ, C. A. Exposición ambiental a toxocariosis como factor asociado al asma en niños de edad escolar. 2004. *Anuario de Investigaciones Médicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, v. 1, p. 67–74, 2004.
- WON, K. *et al.* National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n. 4, p. 552–557, 2008.
- YOUNG, K. H. *et al.* Ethyl acetate as a subsitiue for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 852–853, 1979.
- ZIEGELBAUER, K. *et al.* Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: Systematic review and meta-analysis. *PLoS Medicine*, v. 9, n. 1, 2012.

6.0 CONCLUSÃO GERAL

A toxocaríase é uma zoonose comum e afeta seres humanos. Estudos mostram que a exposição ao parasita é frequente, afetando todas as idades, com uma prevalência maior em crianças de países tropicais e subtropicais.

Concluindo, o presente estudo sobre a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em mulheres grávidas, soro de cordão umbilical, e crianças de 7 meses, nos indica que é alta a infecção pelo *Toxocara* spp. Podemos observar que as mães se infectaram no passado, mostrando uma ELISA de alta avidéz. Não foi observada a transmissão vertical do *Toxocara* spp. já que os anticorpos IgG anti – *Toxocara* spp. observados no soro cordão eram da mãe transmitidos pela placenta e indica proteção até os sete meses de idade. Os anticorpos presentes no cordão umbilical desapareceram observando os resultados negativos nas crianças analisadas aos 7 meses de idade.

Na análise sobre associação entre *Toxocara* spp. e fatores de risco neste grupo de estudo, foi encontrada uma associação negativa, morar em zona rural é um fator de proteção para a infecção por *Toxocara* spp.

Foi percebido que As crianças estudadas começam a infectar-se aos 13 meses de idade e a prevalência aumenta com a idade se tornando alta, chegando aos níveis mais altos como os anticorpos da mãe; provavelmente devido a uma maior exposição a ambientes contaminados com ovos de *Toxocara* spp. as crianças aos 24 meses têm uma maior incidência de ter anticorpos de IgG anti - *Toxocara* spp. a persistência dos anticorpos e a alta prevalência nas idades maiores encontradas no nosso estudo seriam, talvez, pelas reinfecções constantes.

Os fatores de risco para a infecção por *Toxocara canis* estão intimamente relacionadas com contato com, cães e gatos sendo estes uma das fontes principal transmissora da toxocaríase. Crianças de sexo masculino são mais propícios para contagiar-se com *Toxocara* spp. devido aos hábitos comportamentais de brincar.

O *Toxocara* spp. é um importante indutor do aumento de eosinófilos nas crianças soropositivos para esta infecção.

A ausência de associação entre a infecção pelo *Toxocara* spp. e teste cutâneo, sibilâncias, rinite deve-se provavelmente à alta prevalência encontrada de *Toxocara* spp. dificultando as análises logísticas, diminuindo o poder do estudo.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. *et al.* Clinical Features and Course of Ocular Toxocariasis in Adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 5–12, 2014.
- ALCÂNTARA-NEVES, N. *et al.* Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 817, 2014.
- ALCANTARA-NEVES, N. M. *et al.* The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, p. 359–367.e3, fev. 2012.
- ALCÂNTARA-NEVES, N. M. *et al.* An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 349–351, 2008.
- AMARAL, H. *et al.* Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: A risk factor for Visceral Larva Migrans. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1–2, p. 115–118, 2010.
- AMU, S. *et al.* Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 5, p. 1114–1124.e8, 2010.
- ANARUMA FILHO, F. *et al.* Human toxocariasis: Incidence among residents in the outskirts of Campinas, State of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo São Paulo**, v. 45, n. 5, p. 293–294, 2003.
- ARANZAMENDI, C.; SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC, L.; PINELLI, E. Helminths: Immunoregulation and inflammatory diseases - Which side are trichinella spp. and toxocara spp. on? **Journal of Parasitology Research**, v. 2013, 2013.
- ARCHELLI, S.; KOZUBSKY, L. *Toxocara* y Toxocariosis. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 3, p. 379–385, 2008.
- ASHER, M. I. *et al.* International study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): Rationale and methods. **European Respiratory Journal**, v. 8, n. 3, p. 483–491, 1995.
- AVILA, L. *et al.* Registro Da Transmissão Vertical Em Camundongos Balb/C Com Toxocarose Crônica. **VITTALLE - Revista de Ciências Da Saúde**, v. 21, n. 1, p. 9–14, 2009.
- BARRETO, M. *et al.* Impact of a citywide sanitation program in Northeast Brazil on intestinal parasites infection in young children. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 11, p. 1637–1642, 2010.
- BARRETO, M. L. *et al.* Poverty, dirt, infections and non-atopic wheezing in children from a Brazilian urban center. **Respiratory research**, v. 11, n. 1, p. 167, 2010.

- BEAVER, P. C. Larva migrans. **Experimental Parasitology**, v. 5, n. 6, p. 587–621, 1956.
- BERROCAL, J. Prevalence of *Toxocara canis* in babies and in adults as determined by the ELISA test. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 78, n. Fig 1, p. 376–413, 1980.
- BOJANICH, M. D. L. A.; ALONSO, M. V; JOSÉ, M. Efecto de la exposición a *Toxocara canis* en pacientes con asma bronquial . **Universidad Nacional Del Nordeste**, 2006.
- BUIJS, J.; LOKHORST, W.; *et al.* *Toxocara canis* - induced murine pulmonary inflammation : analysis of cells and proteins in lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid. **Parasite immunology** v. 16, p. 1–9, 1994.
- BUIJS, J.; BORSBOOM, G.; *et al.* *Toxocara* seroprevalence in 5-year-old elementary schoolchildren: relation with allergic asthma. **American journal of epidemiology**, v. 140, n. 9, p. 839–847, 1994.
- CAMILLO, L. *et al.* Efeito de bioterápico na eosinofilia durante a SLMV experimental. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Ver.** v. 35, n. 4, p. 701–708, 2014.
- CARVALHO, E. A.; ROCHA, R. L. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **J Pediatr (Rio J)**, v. 87, n. 2, p. 100–110, 2011.
- CASANOVA, L. D. Concentrações séricas de imunoglobulinas em sangue do funículo umbilical e em sangue materno. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 159–166, 2003.
- CHAN, P. W. *et al.* *Toxocara* seroprevalence and childhood asthma among Malaysian children. **Pediatrics International**, v. 43, n. 4, p. 350–353, 2001.
- CHÁVEZ-GÜITRÓN, L. *et al.* The in vitro effect of prolactin on the growth, motility and expression of prolactin receptors in larvae of *Toxocara canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 224, p. 33–38, 2016.
- CHEN, J. *et al.* Canine and feline parasitic zoonoses in China. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 152, p. 1–8, 2012.
- CHIEFFI, P. *et al.* Persistence of specific antibody response in different experimental infections of mice with *Toxocara canis* larvae. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 187–190, 1995.
- CHOI, D. *et al.* Transmission of *Toxocara canis* via ingestion of raw cow liver: A cross-sectional study in healthy adults. **Korean Journal of Parasitology**, v. 50, n. 1, p. 23–27, 2012.
- COLLI, C. *et al.* Serological, clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil [Avaliação sorológica, clínica e epidemiológica da toxocaríase em áreas urbanas do sul do Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 52, n. 2, p. 75–81, 2010.
- CONG, W. *et al.* *Toxocara* seroprevalence among clinically healthy individuals, pregnant women and psychiatric patients and associated risk factors in Shandong Province, Eastern

China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3082, 2014.

COOPER, P. J. *et al.* Cohort Profile: The Ecuador Life (ECUAVIDA) study in Esmeraldas Province, Ecuador. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 5, p. 1517–1527, 2015.

COOPER, P. J. *et al.* Effects of maternal geohelminth infections on allergy in early childhood. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 137, n. 3, p. 899–906.e2, 2016.

COOPER, P. J. UKPMC Funders Group Interactions between helminth parasites and allergy. **Allergy**, v. 9, n. 1, p. 29–37, 2009.

CORREA, C. R. S.; BISMARCK, C. M. Toxocariasis: Incidence, Prevalence and the Time Serum remains Positive in School Children from Campinas, SP, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 56, n. 3, p. 215–216, 2010.

CORREA, J.; ZULIANI, A. Immunity related to allergic response at the beginning of life. **Jornal de Pediatria**, v. 77, p. 441–446, 2001.

DAMIAN, M. M. *et al.* Frequência de anticorpo anti-Toxocara canis em comunidade do Rio Uatumã, no Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 661–664, 2007.

DATTOLI, V. C. C. *et al.* Toxocara canis infection is associated with eosinophilia and total IgE in blood donors from a large Brazilian centre. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 16, n. 4, p. 514–517, 2011.

DE SAVIGNY, D. .; TIZARD, I. . Toxocaral larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 501–507, jan. 1977.

DE SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of Toxocara canis larvae and a simple method for the production of Toxocara ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **The Journal of parasitology**, v. 61, n. 4, p. 781–2, 1975.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis : Clinical Aspects , Epidemiology , Medical Ecology , and Molecular Aspects Toxocariasis . **Society**, v. 16, n. 2, p. 265–272, 2003.

DÍAZ-SUÁREZ, O. *et al.* Seroepidemiología de la toxocariasis en una comunidad indígena yucpa de la Sierra de Perijá al occidente de Venezuela. **Kasmera**, v. 38, n. 2, p. 138–146, 2010.

DUTRA, G. F. *et al.* Evaluation of the initial and chronic phases of toxocariasis after consumption of liver treated by freezing or . **Parasitol Res**, v. 112 p. 2171–2175 n. March, 2013.

DZIEMIAN, E. *et al.* Determination of the relative avidity of the specific IgG antibodies in human toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 30 p. 187–190, 2008.

EL-TRAS, W.; HOLT, H.; TAYEL, A. Risk of Toxocara canis eggs in stray and domestic dog hair in Egypt. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 319–323, 2011.

ESPINOZA, Y. A. *et al.* Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the Northeast of Lima, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 1, p. 31–36, 2010.

FAN, C. K.; LIAO, C. W.; CHENG, Y. C. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 342–352, 2013.

FENOY, S. *et al.* Persistence of immune response in human toxocariasis as measured by ELISA. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 7, p. 1037–1038, 1992.

FERNANDO, D. *et al.* Toxocara seropositivity in Sri Lankan children with asthma. **Pediatrics International**, NULL, v. 51, n. 2, p. 241–245, 2009.

FERREIRA, M. U. *et al.* Bottle feeding and exposure to toxocara as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: A population-based cross-sectional study. **Journal of Tropical Pediatrics**, NULL, v. 53, n. 2, p. 119–124, 2007.

FIALHO, P. M. M.; CORREA, C. R. S. A systematic review of toxocariasis: A neglected but high-prevalence disease in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1193–1199, 2016.

FIGUEIREDO, C. A. *et al.* Does IFN- γ play a role on the pathogenesis of non-atopic asthma in Latin America children? *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology*: **Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology**, v. 8, n. 1, p. 18, 2012.

FIGUEIREDO, S. *et al.* Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 2, p. 126–132, 2005.

FINSTERER, J.; AUER, H. Parasitoses of the human central nervous system. **J Helminthol**, v. 87, n. 3, p. 257–270, 2013.

FRAGOSO, R. *et al.* Anti-Toxocara antibodies detected in children attending elementary school in Vitoria, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 461–466, 2011.

FU, C. *et al.* Seroepidemiology of Toxocara Canis infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 261, 15 dez. 2014.

GEIGER, S. M. *et al.* Cellular responses and cytokine profiles in Ascaris lumbricoides and Trichuris trichiura infected patients. **Parasite Immunology**, v. 24 n. February, p. 499–509, 2002.

RIVAROLA, C. *et al.* Toxocara Canis en Población Pediátrica Rural. **Pediatr (Asunción)**, v. 36, n. 2, p. 122- 126, 2009

GLOBAL ASTHMA NETWORK. **The Global Asthma Report 2014**. [S.l: s.n.], 2014. v. 5.

HABLUETZEL, A. *et al.* An estimation of Toxocara canis prevalence in dogs, environmental

egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3–4, p. 243–252, 2003.

HAYASHI, E. *et al.* The high prevalence of asymptomatic *Toxocara* infection among schoolchildren in Manado, Indonesia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 36, n. 6, p. 1399–1406, 2005.

HEUKELBACH, J.; FELDMEIERS, H. *Epidemiological and clinical characteristics of hookworm-related cutaneous larva migrans*. **The Lancet Infectious Diseases**. [S.l: s.n.], 2008

HOSOKI, K. *et al.* Analysis of a Panel of 48 Cytokines in BAL Fluids Specifically Identifies IL-8 Levels as the Only Cytokine that Distinguishes Controlled Asthma from Uncontrolled Asthma, and Correlates Inversely with FEV1. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126035, 26 maio 2015.

HUAPAYA H, P. *et al.* Toxocariosis humana: ¿problema de salud pública? Human toxocariosis: a public health problem? **An Fac med**, v. 70, n. 4, p. 283–90, 2009.

IGNACAK, A. *et al.* Prolactin - Not only lactotrophin a “new” view of the “old” hormone. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 435–443, 2012.

JIN, Z.; AKAO, N.; OHTA, N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasitology International**, v. 57, n. 4, p. 495–498, 2008.

JOHANSSON, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 832–836, 2004.

KANOBANA, K. *et al.* *Toxocara* seropositivity, atopy and asthma: A study in Cuban schoolchildren. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 4, p. 403–406, 2013.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple Devive for quantitativa stool Thick-smear technique in shistosomiasis mansoni. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397 - 400 Novembro, 1972.

KENNEDY, M. W. *et al.* Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, v. 9, n. 4, p. 407–420, 1987.

KRISTOFFERSEN, E. K. Placental Fc receptors and the transfer of maternal IgG. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 14, n. 3, p. 234–243, 2000.

KROTEN, A. *et al.* Environmental contamination with *Toxocara* eggs and seroprevalence of toxocariasis in children of northeastern Poland. **Parasitology Research**, v. 115, n. 1, p. 205–209, 2016.

LAI, C. K. W. *et al.* Global variation in the prevalence and severity of asthma symptoms: phase three of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 64, n. 6, p. 476–483, 2009.

- LEE, A. C. Y. *et al.* Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 155–161, 2010.
- LEE, K. T.; MIN, H.; SOH, C. Migration of toxocara canis larvae in experimentally infected. **The journal of parasitology**, v. 62, n. 3, p. 460–465, 2015.
- LESCANO, S. *et al.* Anti-helmínticos na toxocaríase experimental: efeito na recuperação de larvas de Toxocara canis e na resposta humoral. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 1, p. 2–5, 2005.
- LIAO, C. *et al.* Seroprevalence of Toxocara canis infection among children in Swaziland, southern Africa. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 104, n. 1, p. 73–80, 2010.
- LOUKAS, A *et al.* Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of Toxocara canis, which binds to host ligands. **Parasitology**, v. 121 Pt 5, p. 545–554, 2000.
- MACPHERSON, C. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12–13, p. 999–1008, 2013.
- MAFFRAND, R. *et al.* [Congenital ocular toxocariasis in a premature neonate]. **Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)**, v. 64, n. 6, p. 599–600, jun. 2006.
- MAIZELS, R. M. Infections and allergy - Helminths, hygiene and host immune regulation. **Current Opinion in Immunology**, v. 17, n. 6, p. 656–661, 2005.
- MAIZELS, R. M. Toxocara canis: Molecular basis of immune recognition and evasion. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 365–374, 2013.
- MANINI, M. *et al.* Association between contamination of public squares and seropositivity for Toxocara spp. in children. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1–2, p. 48–52, 2012.
- MANTYJARVI, R.; HIRVONEN, T.; TOIVANEN, P. Maternal antibodies in human neonatal sera. **Immunology**, v. 18, n. 3, p. 449–451, 1970.
- MASOLI, M. *et al.* The global burden of asthma: Executive summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 59, n. 5, p. 469–478, 2004.
- MATTIA, S. *et al.* Seroprevalence of Toxocara infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **Journal of helminthology**, v. 86, n. 4, p. 440–5, 2012.
- MENDONÇA, L. *et al.* Seroprevalence and risk factors for Toxocara infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 90–95, 2013.
- MENDONÇA, L. *et al.* Toxocara Seropositivity, Atopy and Wheezing in Children Living in Poor Neighbourhoods in Urban Latin American. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1–9, 2012.

MOREIRA, G. *et al.* Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 456–464, 2014.

MPAIRWE, H.; TWEYONGYERE, R.; ELLIOTT, A. Pregnancy and helminth infections. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 328–337, 2014.

NAGATA, Y. *et al.* Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 144, n. 4, p. 305–314, 2007.

NAGY, D. *et al.* Analysis of serum cytokine levels in children with chronic cough associated with *Toxocara canis* infection. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 581–588, 2012.

NEGRI, E. *et al.* Anti-*Toxocara* spp. antibodies in an adult healthy population: Serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 3, p. 211–216, 2013.

NOH, Y. *et al.* Meningitis by *Toxocara canis* after ingestion of raw ostrich liver. **Journal of Korean Medical Science**, v. 27, n. 9, p. 1105–1108, 2012.

OKOKO, B. J. *et al.* Influence of placental malaria infection and maternal hypergammaglobulinaemia on materno-foetal transfer of measles and tetanus antibodies in a rural west African population. **Journal of health, population, and nutrition**, v. 19, n. 2, p. 59–65, 2001.

OLIART-GUZMÁN, H. *et al.* Epidemiology and control of child toxocariasis in the Western Brazilian Amazon - A population-based study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 670–681, 2014.

OVERGAAUW, P.; NEDERLAND, V. Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Toxocarosis in Dogs and Cats. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 233–251, 1997.

OVERGAAUW, P.; VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 398–403, 2013.

PAGE, A. P. *et al.* *Toxocara canis*: A labile antigenic surface coat overlying the epicuticle of infective larvae. **Experimental Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 72–86, 1992.

PALMEIRA, P. *et al.* IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.

PARSONS, J. C. Ascarid infections of cats and dogs. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 17, n. 6, p. 1307–39, 1987.

PATEL, S. P.; JÄRVELIN, M.-R.; LITTLE, M. P. Systematic review of worldwide variations of the prevalence of wheezing symptoms in children. **Environmental health : a global access science source**, v. 7, p. 57, 2008.

PAUL, M. *et al.* The co-occurrence of *Toxocara ocular* and visceral larva migrans syndrome:

a case series. **Cases Journal**, v. 2, p. 6881, 2009.

PEARCE, N. *et al.* Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Thorax**, v. 62, n. 9, p. 758–66, 2007.

PEARCE, N.; PEKKANEN, J.; BEASLEY, R. How much asthma is really attributable to atopy? Topic collections How much asthma is really attributable to atopy? **Thorax**, v. 54, p. 268–272, 1999.

PECINALI, N. R. *et al.* Influence of murine *Toxocara canis* infection on plasma and bronchoalveolar lavage fluid eosinophil numbers and its correlation with cytokine levels. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1–2, p. 121–130, 2005.

PINELLI, E. *et al.* A comparative study of toxocariasis and allergic asthma in murine models. **Journal of helminthology**, v. 75, n. 2, p. 137–140, 2001.

PINELLI, E. *et al.* *Toxocara canis*: Effect of inoculum size on pulmonary pathology and cytokine expression in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 76–82, 2007.

PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. *Toxocara* infection and its Association with Allergic Manifestations. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 33–44, 2012.

PRESS, A. Influence of Pregnancy and Lactation on Migration of the Larvae of *Toxocara canis* in Mice Author (s): Tomoo Oshima Published by: Allen Press on behalf of The **American Society of Parasitologists** Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3275080> REFERENCE. v. 47, n. 4, p. 657–660, 2016.

PRESTES-CARNEIRO, L. E. *et al.* Sero-epidemiology of toxocariasis in a rural settlement in São Paulo state, Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 102, n. 4, p. 347–56, 2008.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Diagnóstico de la toxocarosis humana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 2010a.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Diagnóstico de la toxocarosis humana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, n. 4, p. 613–620, 2010b.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Frequency of eosinophilia and risk factors and their association with *Toxocara* infection in schoolchildren during a health survey in the North of Lima, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 273–278, 2008.

ROLDÁN, W. H. *et al.* Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by dot-Elisa test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 2, p. 67–71, 2009.

ROMERO NÚÑEZ, C. *et al.* Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 572089, 2013.

- RUBINSKY-ELEFANT, G. *et al.* Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 104, n. 1, p. 3–23, 2010.
- SANTOS, P. C. *et al.* The seropositivity of *Toxocara* spp. antibodies in pregnant women attended at the university hospital in Southern Brazil and the factors associated with infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–10, 2015.
- SARIEGO, I. *et al.* Toxocariasis in cuba: A literature review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2012.
- SCHNIEDER, T.; LAABS, E.; WELZ, C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 3–4, p. 193–206, 2011.
- SCHOENARDIE, E. *et al.* Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 403–406, set. 2014.
- SCHOENARDIE, E. *et al.* Vertical transmission of *Toxocara canis* in successive generations of mice. **Revista brasileira de parasitologia veterinária Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 623–6, 2013.
- SCHOENARDIE, E. R. *et al.* Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 537–539, 2013.
- SHARGHI, N. *et al.* Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, NULL, v. 32, n. 7, p. E111–E116, 2001.
- SILVA, M. *et al.* Risk factors for *Toxocara* spp. seroprevalence and its association with atopy and asthma phenotypes in school-age children in a small town and semi-rural areas of Northeast Brazil. **Acta Tropica**, p. 1–7, 2016.
- SMITH, H. *et al.* How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 182–188, 2009.
- SMITS, H. H. *et al.* Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 10, n. 1, p. 3–12, 2010.
- SOUZA, R. *et al.* [Prevalence and risk factors of human infection by *Toxocara canis* in Salvador, State of Bahia, Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 516–519, 2011.
- SOUZA DA CUNHA, S. *et al.* Asthma cases in childhood attributed to atopy in tropical area in Brazil. **Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health**, v. 28, n. 6, p. 405–411, 2010.
- STENSVOLD, C. R. *et al.* Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 9, p. 1372–1373, 2009.

STRUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. Toxocara spp. infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n. 4, p. 375–389, 2013.

SUBRATA, L. S. *et al.* Interactions between innate antiviral and atopic immunoinflammatory pathways precipitate and sustain asthma exacerbations in children. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 183, n. 4, p. 2793–2800, 2009.

TAYLOR, M. R. H. *et al.* Toxocara titres in maternal and cord blood. **Journal of Infection**, v. 32, n. 3, p. 231–233, 1996.

THOMPSON, D. E. *et al.* Epidemiological characteristics of Toxocara canis zoonotic infection of children in a Caribbean community. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 64, n. 2, p. 283–290, 1986.

TOIVANEN, P.; MANTYJARVI, R.; HIRVONEN, T. Maternal Antibodies in Human Foetal Sera at Different Stages of Gestation. **Immunology**, v. 15, n. 395, 1968.

TORINA, A. *et al.* Toxocara canis infection induces antigen-specific IL-10 and IFN- γ production in pregnant dogs and their puppies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 247–251, 2005.

TORRES, H. E.; LOPEZ, C. A. Exposición ambiental a toxocarosis como factor asociado al asma en niños de edad escolar. 2004. *Anuario de Investigaciones Médicas*. **Pontificia Universidad Católica del Ecuador**, v. 1, p. 67–74, 2004.

UMETSU, D. T. *et al.* Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. **Nature immunology**, v. 3, n. 8, p. 715–20, 2002.

VAN DEN BERG, J. P. *et al.* Lower transplacental antibody transport for measles, mumps, rubella and varicella zoster in very preterm infants. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

VARGAS, C. *et al.* Frequency of anti- toxocara spp. antibodies in individuals attended by the centro de salud familiar and environmental contamination with toxocara canis eggs in dog feces, in the coastal nebl town, Chile. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 1–7, 2016.

VON MUTIUS, E. 99th Dahlem Conference on Infection, Inflammation and Chronic Inflammatory Disorders: Farm lifestyles and the hygiene hypothesis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 1, p. 130–135, 2010.

WEISS, S. T.; BOSTON, M. S. Parasites and asthma / allergy : What is the relationship? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, p. 205–210, 2000.

WENZEL, S. E. Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. **Nature Medicine**, v. 18, n. 5, p. 716–725, 4 maio 2012.

WHO. Prevention of Allergy and Allergic Asthma. **Management of Noncommunicable Diseases Department**, n. January, p. 8–9, 2002.

WOLD, A E. The hygiene hypothesis revisited : . is the frequency of allergy due to changes

in the intestinal flora ? **Allergy**, v. 53, n. Suppl 46, p. 20–25, 1998.

WON, K. *et al.* National seroprevalence and risk factors for zoonotic *Toxocara* spp. infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 4, p. 552–557, 2008.

WOO, Y. *et al.* The Roles of Innate Lymphoid Cells in the Development of Asthma. **Immune Network**, v. 14, n. 4, p. 171–181, 2014.

WORLEY, G. *et al.* *Toxocara canis* Infection: Clinical and Epidemiological Associations with Seropositivity in Kindergarten Children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, n. 4, p. 591–597, 1 abr. 1984.

YAZDANBAKHSH, M.; MATRICARDI, P. M. Parasites and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. April, p. 490–494, 2002.

YOUNG, K. H. *et al.* Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 852–853, 1979.

ZHU, X.-Q. *et al.* Genetic blueprint of the zoonotic pathogen *Toxocara canis*. **Nature communications**, v. 6, p. 6145, 2015.

ZIEGELBAUER, K. *et al.* Effect of sanitation on soil-transmitted helminth infection: Systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 1, 2012.