

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Relações filogenéticas de *Toxocara* spp. e
Toxascaris sp. provenientes de diferentes regiões
do mundo**

Natália de Melo Nasser Fava

Uberlândia

Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Relações filogenéticas e filogeográficas de
Toxocara spp. e *Toxascaris* sp. provenientes de
diferentes regiões do mundo**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de Doutor

Natália de Melo Nasser Fava

Aluna

Prof^a. Dr^a Márcia Cristina Cury

Orientadora

Prof. Dr. Peter Nejsum

Coorientador

Uberlândia

Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Relações filogenéticas de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp.
provenientes de diferentes regiões do mundo**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como parte de obtenção do título de Doutor

Área de concentração: Parasitologia

Profª. Drª. Suzana Angélica Zevallos Lescano

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Prof. Dr. Carlos Ueira Vieira

Drª. Juliana Silva Miranda

Profª. Drª. Márcia Cristina Cury

Uberlândia

Julho-2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F272r
2017 Fava, Natalia de Melo Nasser, 1988
Relações filogenéticas de *Toxocara spp.* e *Toxascaris sp.*
provenientes de diferentes regiões do mundo / Natalia de Melo Nasser
Fava. - 2017.
112 p. : il.

Orientadora: Marcia Cristina Cury.
Coorientador: Peter Nejsum.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Nematódeos - Teses. 3. Microscopia -
Técnica - Teses. I. Cury, Marcia Cristina. II. Nejsum, Peter. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

Dedicatória

A Deus, meu sossego e meu conforto, razão principal de todas as coisas.

À minha mãe, fonte inesgotável de amor. Pela mão, que quando entrelaçada à minha, direciona, dá força e coragem, pelo colo que cura qualquer dor, e pelo sorriso que afasta qualquer monstro. Ah, se todos no mundo fossem iguais à você!

Ao meu amor dessa e de todas as outras vidas, Rafael, por sonhar meus sonhos comigo. Por me lembrar, todos os dias, que minhas escolhas são feitas por amor, e que amor nunca é demais! Eu não conseguiria sem você. Nosso time é o melhor!

À minha amada tia Vera, por me ensinar que meus horizontes são do tamanho da minha vontade. Nós conseguimos tia!

Agradecimentos

Às mulheres fortes da minha vida, Vovó Nair, Vovó Luzia, Tia Beth, Tia Heloísa e Nara, que me inspiram a cada dia. Obrigada pelo amor de sempre. Saibam que eu se eu cheguei até aqui, com certeza foi porque trouxe um pouco de vocês pelo caminho.

À minha FAMÍLIA de amigos, que fazem meus dias mais leves e felizes. Cada abraço, cada sorriso e cada palavra de carinho me ajudaram a vencer etapa por etapa. Sintam-se parte fundamental dessa conquista!! Eu amo vocês, Gordice!

Às minhas amigas da vida, Paula e Mariana por entenderem minhas ausências sem nunca duvidarem do meu amor.

Às minhas florzinhas Maria Júlia, Letícia, Kelem, Talita, Camila, Juliana, Daliane e Luana que eu levo do laboratório pra vida. Vocês são definitivamente o maior e melhor presente que a UFU já me deu. Nossos encontros me renovam. Vocês não sabem como fazem diferença!!

À Profª. Drª. Márcia Cristina Cury, pela confiança dedicada, e por extrair de mim o meu melhor. Você é muito responsável pela profissional que sou e por onde cheguei. Mas mais do que isso, obrigada por fazer parte da minha vida. Você também me inspira!

Ao Professor Dr. Peter Nejsun, da Universidade de Copenhagen, pelos ensinamentos durante o período de doutorado sanduíche e pela parceria mantida, mesmo após o fim.

A Iasmin, pelo auxílio na formatação do trabalho e pelas incontáveis risadas.

Aos amigos do laboratório de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos por propiciarem um ambiente tão bom de trabalho.

Aos colaboradores Nao Takeushi-Storm, Profª. Drª. Katharina Raue, Prof. Dr. Xing-Quan Zhu, Profª. Drª. Taira Kensuke, Profª. Drª. Irina Odоеvskaya e Profª. Dra. Teresa Mateus pelo fornecimento de amostras, que muito contribuíram para esse trabalho.

Pensamento

*“E a coisa mais divina que
há no mundo é viver cada
segundo como nunca
mais”*

(Vinícius de Moraes)

Lista de figuras

Figura 1 – Ovos de <i>Toxocara</i> spp. (A) e <i>Toxascaris leonina</i> (B) observados em microscópio óptico em objetiva de 40X e corados com lugol após técnica de centrífugo flutuação em Sulfato de Zinco 33%. Fonte: Acervo da autora.....	29
Figura 2 – Espécime adulto de <i>Toxocara</i> spp. observado em microscópio estereoscópico. Fonte: Acervo da autora	30
Figura 3 - Extremidade anterior com aletas cefálicas em evidência, de <i>T. canis</i> (A), <i>T. cati</i> (B), <i>T. malaysiensis</i> (C) e <i>T. leonina</i> (D).....	30
Figura 4 - Fluxograma das etapas do experimento	46
Figura 5A - Mapa de restrição para <i>Toxocara canis</i> feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.	55
Figura 5B - Mapa de restrição para <i>Toxocara cati</i> feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.	56
Figura 5C - Mapa de restrição para <i>Toxocara malaysiensis</i> feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.	57
Figura 5D - Mapa de restrição para <i>Toxocara leonina</i> feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.	58
Figura 6 - Extremidade anterior de <i>Toxocara canis</i> observada em microscópio esteoreoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora	61
Figura 7 - Extremidade anterior de <i>Toxascaris leonina</i> observada em microscópio esteoreoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora.....	62
Figura 8 - Extremidade anterior de <i>Toxocara cati</i> observada em microscópio esteoreoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora	62
Figura 9 - Ovos de <i>Toxascaris leonina</i> observados em microscópio óptico na objetiva de 40X e corados com Lugol. Setas indicam a membrana externa lisa. Fonte: acervo da autora	63
Figura 10 - Fragmentos de 490pb do gene Cox1 em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Marcador de peso molecular - 100pb.....	64

Figura 11 - Relações filogenéticas entre espécimes de *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* e *T. leonina* de diferentes regiões do mundo inferidas a partir de sequencias parciais do gene Cox1 utilizando o método Neighbor-Joining com bootstraps estabelecidos em 1000 réplicas.....66

Figura 12 - Padrões de restrição gerados pela reação de PCR-RFLP com enzima MseI visualizados em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Linha 1 – Fragmento de gene cox1 integral; Linha 2 – *T. canis*; Linha 3 – *T. cati*, Linha 4 - *T. malaysiensis*; Linha 5 – *T. leonina*. Marcador de peso molecular – 100pb68

Figura 13 - Padrões de restrição gerados pela reação de PCR-RFLP com enzima MseI visualizados em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Linha 1 – CDK2_1 (padrão de *T. canis/T. leonina*); Linha 2 – CBRU38_1 (padrão de *T. canis/T. leonina*); Linha 3 – DRU2_1 (padrão de *T. cati*); Linha 4 – CML1_1 (padrão de *T. cati*). Marcador de peso molecular – 100pb70

Lista de tabelas

Tabela 1 - Perfil epidemiológico e demográfico dos animais dos quais foram obtidos os ascaridídeos analisados nesse estudo	48
Tabela 2 – Número de amostras coletadas, provenientes de canídeos e felídeos, em cada país incluído nesse estudo.....	50
Tabela 3 - Primers utilizados nas reações de PCR para amplificação de fragmento do gene cox1	53
Tabela 4 - Número de acesso das sequências disponíveis do GenBank utilizadas como referências para análises filogenéticas nesse estudo	59
Tabela 5 - Quantidade de helmintos, provenientes de cada país abrangido nesse estudo, (adultos e ovos) submetidos à reação de sequenciamento do fragmento do gene cox1	64
Tabela 6 - Isolados analisados e número de referências das sequências disponíveis no Genbank homólogas à eles	67

Sumário

1.	Introdução geral.....	23
1.1	- Histórico.....	26
1.1.1	<i>Toxocara canis</i>	26
1.1.2	<i>Toxocara cati</i>	27
1.1.3	<i>Toxocara malaysiensis</i>	27
1.1.4	<i>Toxascaris leonina</i>	27
1.2	Morfologia.....	28
1.3	Biologia	31
1.4	Aspectos clínicos e sintomatologia da Toxocaríase	32
1.5	Métodos diagnósticos	34
1.6	Prevalência	35
1.7	Potencial zoonótico	36
1.8	Especificidade de hospedeiro	37
1.9	Biologia Molecular.....	38
1.10	Distribuição geográfica e variabilidade intragenotípica	40
2.	Justificativa.....	42
3.	Objetivos	44
4.	Metodologia.....	46
1.	Aprovação ética.....	47
2.	Regiões do estudo.....	47
3.	População de estudo:	47
4.	Coleta dos Parasitos.....	50
5.	Processamento dos parasitos	51
6.	Identificação morfológica.....	51
7.	Identificação molecular	51
7.1	Extração do DNA	52
7.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Realizada na Universidade de Copenhagen – DK) 52	
7.3	Sequenciamento (Realizada na Universidade de Copenhagen – DK).....	53
7.4	Reações de Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP-PCR)	53
7.5	Análise filogenética	59
5	Resultados	61

1.	Análise morfológica	61
2.	Análises molecular	63
2.1	PCR	63
2.3	RFLP	67
2.4	Variabilidade genotípica intra e interespecífica associadas à distribuição geográfica	68
2.5	Comparação entre a técnica morfológica e as moleculares na determinação da espécie parasito	69
6	Discussão.....	72
7	Conclusões	83
8	Bibliografia.....	85

Resumo

Os nematódeos dos gêneros *Toxocara* e *Toxascaris* são identificados, tradicionalmente, com base nos aspectos morfológicos, entretanto a diversidade genética entre esses parasitos é reconhecida, sendo a análise precisa dessa variação é necessária para o entendimento da biologia desses organismos. Esse trabalho teve como objetivos estabelecer relações filogenéticas e filogeográficas entre espécimes de *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara malaysiensis* e *Toxascaris leonina*, e comparar os resultados das técnicas morfológica e moleculares. Foram coletados 436 helmintos adultos e quatro “pools” de ovos de canídeos e felídeos, procedentes de oito países. Os parasitos foram analisados por microscopia estereoscópica, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e “Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP). Os primers TOXCOIF3 e TOXCOIF2 foram desenhados para amplificar 490 pares de base do gene mitocondrial Cox1 e a PCR-RFLP foi realizada utilizando-se a enzima MseI. As relações filogenéticas entre os isolados foram observados no filograma e pelo cálculo das taxas de variabilidade genotípicas (distância filogenética). Dos 313 parasitos adultos provenientes de cães, 309 foram identificados, por microscopia, como *T. canis* e quatro como *T. leonina*. Dos 123 oriundos de gatos, 118 foram identificados como *T. cati*, quatro *T. malaysiensis* e um *T. leonina*. Dentre os “pools” de ovos, os três de leões foram identificados como *T. leonina* e o de cão como *T. canis*. A PCR em todas as amostras analisadas (n=440) apresentou falha de 3,6%. Das amostras amplificadas (n=424) 72 foram selecionadas para o sequenciamento. Com exceção de três amostras, duas provenientes de gato foram caracterizadas como *T. canis*, e uma proveniente de cão como *T. cati*, todas as restantes foram caracterizadas em concordância com os respectivos hospedeiros. Das 424 amostras submetidas a PCR-RFLP, 351 foram identificadas como *T. canis/T. leonina*, 70 como *T. cati* e três como *T. malaysiensis*. Essa técnica apresentou resultados semelhantes ao sequenciamento. Foram observadas homologia e variação genotípica nas espécies, sendo a maior 6,6%. Relações filogeográficas, dentro das espécies, puderam ser observadas pelo filograma. Entre as técnicas, observou-se 9,7% de incongruência de resultados entre microscopia e sequenciamento e 0,9% entre microscopia e PCR-RFLP. Entre as técnicas moleculares, considerou-se somente *T. cati* e *T. malaysiensis*, o que significou 100% de concordância entre resultados. A partir dos achados desse trabalho, conclui-se que alguns isolados, da mesma espécie, apresentaram variabilidade intragenotípica; Sequências homólogas foram identificadas em diferentes países, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico; A procedência geográfica teve relação direta com a variação genética dos parasitos; *T. canis* e *T. cati* apresentaram taxa de variabilidade semelhante às de *T. cati* e *T. leonina*; E as três técnicas utilizadas apresentaram resultados que indicam a preferência de *T. canis*, *T. cati* e *T. malaysiensis* por determinados hospedeiros.

Palavras chave: *Toxocara* spp., *Toxascaris*, relações filogenéticas, filogeografia, especificidade de hospedeiro, microscopia e técnicas morfológicas.

Abstract

The nematodes of the genus *Toxocara* and *Toxascaris* are identified, traditionally, based on the morphologic aspects, however the genetic diversity among these parasites is recognized, being an accurate analysis of this variation necessary for the understanding of the biology of these organisms. This work aimed to establish the phylogenetic and phylogeographic relationships among specimens of *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara malaysiensis* and *Toxascaris leonina* and to compare the results given by the morphologic and molecular techniques. In total, 436 helminths adults and four pools of eggs were collected from canids and felines from eight countries. The parasites were analyzed by stereoscopic microscopy, by Polymerase Chain Reaction (PCR) and by Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Primers TOXCOIF3 and TOXCOIR2 were designed in order to amplify 90pb of the mitochondrial gene Cox1, and the PCR-RFLP using the enzyme MseI could discriminate between these four species. The phylogenetic relationships among the isolates were observed in the phylogram and by the genetic variability (phylogenetic distance) rates. Of the 313 parasites adults, from dogs, 309 were identified, by microscopy, as *T. canis* and four as *T. leonina*. Of 123 originating from cats 118 were identified as *T. cati*, four as *T. malaysiensis* and one as *T. leonina*. Among the pools the three from lions were identified as *T. leonina* and that of dog as *T. canis*. PCR in all analyzed samples (n=440) failed in 3,6%. Of the amplified samples (n=424) 72 were selected to sequencing. With the exception of three samples, two from cats, were characterized as *T. canis* and one from dog as *T. cati*, all remaining were identified in agreement with their respective hosts. Of the 424 samples submitted to PCR-RFLP 351 were identified as *T. canis/T.leonina*, 70 as *T. cati* and three as *T. malaysiensis*. This technique presented similar results to sequencing. Homology and genotypic variation were observed within species, being the largest one 6.6%. Phylogeographic relationships within species could be observed by the phylogram. Among the techniques it was observed 9,7% of incongruence in the results between microscopy and sequencing, and 0,9% between microscopy and PCR-RFLP. Between the molecular techniques, it was considered only *T. cati* and *T. malaysiensis* which meant 100% of agreement. Based on the findings, of this study, it was concluded that some isolates of the same specie presented intragenotypic variability; Homologous sequences were identified in different countries, suggesting the occurrence of gene flow; The geographic origin was directed related to the genetic variation of the parasites; *T. canis* and *T. cati* presented variability rates similar to *T. cati* and *T. leonina*; And the three techniques used, herein, showed results that indicate a preference of *T. canis*, *T. cati* and *T. malaysiensis* for certain hosts.

Keywords: *Toxocara* spp., *Toxascaris* sp., phylogenetic relationships, host specificity, microscopy, molecular techniques

Introdução

1. Introdução geral

A superfamília Ascaridoidea é constituída de 50 gêneros que parasitam vários grupos de hospedeiros vertebrados (Fagerholm, 1991). Dentre eles, estão os gêneros *Toxocara* e *Toxascaris* os quais possuem espécies que parasitam canídeos e felídeos, algumas com significância na saúde humana (Sprent 1992). O gênero *Toxocara* tem particular importância, compreendendo 21 espécies sendo *Toxocara canis* e *Toxocara cati* os endoparasitos mais prevalentes em todo o mundo.

T. canis e *T. cati* e *T. malaysiensis* são helmintos gastrointestinais de canídeos e felídeos, cujas fêmeas produzem em torno de 200 mil ovos por dia (Glickman & Schantz, 1981). Esses parasitos possuem transmissão oral-fecal e o ciclo e a epidemiologia são dependentes de fatores ambientais. Os ovos são excretados não embrionados e, sob condições ideais podem ficar viáveis por até um ano (Lloyd, 1993). Estudos ao redor do mundo têm demonstrado taxas entre 10-30% de contaminação de solos, jardins, parques e outros lugares públicos por ovos de *Toxocara* spp. (Mizgajaska-Wiktor & Uga, 2006). O desenvolvimento larvário até a forma evolutiva infectante ocorre, geralmente, em um período de três semanas até meses, dependendo do clima e do tipo do solo (Overgaauw, 1997).

Apesar dos canídeos e felídeos serem considerados hospedeiros definitivos, larvas podem persistir ou causar grave doença em várias espécies de hospedeiros paratênicos. No interior desses hospedeiros as larvas possuem comportamento similar ao que ocorre nos hospedeiros definitivos, porém sem que haja o desenvolvimento até a fase adulta do parasito, sendo a infecção pela larva de terceiro estágio persistente nos tecidos em forma latente.

A toxocaríase em cães e gatos é infecção helmíntica comum, sendo rotina na clínica médica veterinária. É zoonose ocasionada pela ingestão acidental de ovos embrionados dos nematódeos dos gêneros *Toxocara* e *Toxascaris*. Devido a esse aspecto é importante para humanos, sendo comumente relatada, com interesse crescente em relação à biologia e epidemiologia desses parasitos (Magnaval et al., 2001). Embora a maioria das infecções humanas seja atribuída ao *T. canis*, o potencial zoonótico de *T. cati* não deve ser subestimado, já que as frações antigênicas são partilhadas entre essas duas espécies. Além disso modelos em animais infectados, experimentalmente, mostram que ambas se comportam de forma semelhante após a eclosão (Strube et al., 2013).

Toxascaris leonina é outro nematódeo de canídeos e felídeos embora apresente menor frequência e seja menos estudado do que os outros ascaridídeos de carnívoros. A fase parasitária, não migratória, restringe-se ao intestino delgado dos hospedeiros definitivos. Este parasito pode

ser confundido com o *Toxocara canis*, sendo a diferenciação realizada por este não possuir o processo digitiforme na cauda do macho e pela forma das aletas na extremidade anterior dos parasitos (Urquhart et al., 1996). Os ovos desenvolvem-se e, normalmente atingem a fase infectante em torno de uma semana, contrastando com as quatro semanas das espécies de *Toxocara*. O rápido desenvolvimento dos ovos pode explicar a persistência da infecção do *T. leonina* em canis, mesmo aqueles em boas condições de controle sanitário (Bowman et al., 2009). O ciclo biológico deste parasito, também, é caracterizado pelo rápido desenvolvimento da fase larval infecciosa e, pela facilidade de parasitar hospedeiros paratênicos, os quais constituem problema para o aumento da prevalência e contaminação do ambiente. Segundo Cho et al. (2009) o *Toxascaris leonina* pode ser também considerado agente zoonótico, pois foram capazes de invadir tecidos de animais infectados experimentalmente. Entretanto, existem dúvidas sobre o grau de envolvimento em produzir em doenças nos humanos (Holland e Smith, 2006).

São vários os mecanismos responsáveis pela manutenção de infecções naturais em cães e gatos, por *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. De acordo com Overgaauw (1997) a infecção por esses gêneros ocorre, nos animais, pela via transplacentária (cães), lactogenica (cães e gatos), ingestão de ovos embrionados presentes no meio ambiente e ingestão de larvas (em fezes de animais recém nascidos ou pelo consumo do hospedeiro paratênico). Aproximadamente 100% dos filhotes são infectados no útero pela reativação de larvas somáticas e após o nascimento a principal fonte passa a ser o leite materno (Lloyd et al., 1983).

Prevalências, especialmente, em animais abandonados, destacam a necessidade de compreender a biologia dos parasitos em outros hospedeiros, que não sejam espécies-específicos. A prevalência nos hospedeiros depende do ambiente, assim como das condições higiênicas. O aumento da população de roedores em áreas urbanas pode atrair predadores, que servirão de reservatórios para *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. e para outros parasitos zoonóticos que acometem cães e gatos (Reperant et al., 2009).

Pesquisas epidemiológicas indicam que a prevalência do *T. canis* em cães está entre 5,5% e 64,7% (Oliveira-Sequeira et al., 2002; Rubel et al., 2003; Wang et al., 2006; Daí et al., 2009) e a do *T. cati* em gatos é de 4,7% a 55,2% (Mircean et al., 2010; Barutzki e Schaper, 2011; Khalafalla, 2011). Nos trabalhos realizados por Santos (2001) e Barbosa et al., (2005) o *Toxascaris leonina* apresentou prevalências superiores a do *T. canis* em carnívoros domésticos e silvestres.

A soroprevalência da Toxocaríase humana em países da Europa, tais como França, República Tcheca e Áustria varia entre 2% a 40%, sendo mais alta nas áreas rurais. Em países tropicais, como Indonésia e Brasil foram relatados índices entre 8% e 63% (Anaruma Filho et al.,

2002; Figueiredo et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Strube et al., 2013). Dados epidemiológicos demonstram ser a toxocariase prevalente helmintíase em países industrializados, representando típica doença negligenciada e problema de saúde pública (MagnaVal et al., 2001; Turrientes et al., 2011).

Em humanos os estádios larvais são inábeis para a maturação em parasitos adultos, os quais migram pelo tecido causando danos e manifestações clínicas. O risco de infecções para humanos aumenta com a prática da geofagia, consumo de alimentos crus, principalmente vegetais, e pobres condições de higiene (MagnaVal et al., 2001, Mattia et al., 2012). Parques, praças e áreas de recreação em escolas são locais de potencial risco para a transmissão, devido à possível contaminação do local com ovos desses helmintos. A ingestão de carne crua ou mal cozida de coelho, porco, frango ou fígado de bovino tem sido considerada via de transmissão para Toxocariase humana (Kwon et al., 2006).

O quadro clínico da toxocariase humana tem sido classificado em quatro grupos distintos denominados de: Larva *migrans* visceral (LMV), Larva *migrans* ocular (LMO), Neurotoxocariase (NT) e 'Covert toxocariase' (CT) (MagnaVal et al., 2001; Chen et al., 2012). O amplo espectro das consequências clínicas e patológicas da toxocariase, assim como, frequentes infecções inaparentes, podem causar dificuldade na identificação e classificação de casos clínicos. A gravidade e o padrão sintomatológico dependem do tecido invadido, do número de larvas migrantes no tecido e da idade do hospedeiro.

Tradicionalmente os nematódeos dos gêneros *Toxocara* e *Toxascaris* são classificados com base nos aspectos morfológicos e "habitat" nos hospedeiros (Borecka et al., 2010). Sprent (1983) avaliou relevância taxonômica de recursos, tais como as estruturas labiais, esôfago, ceco, sistema excretório e cauda do macho. A partir dessas características várias espécies de *Toxocara* foram classificadas tais como, *T. canis* (canídeos), *T. cati* (felídeos), *T. lynxus* (felídeos selvagens), *T. vitulorum* (bovinos), *T. tanuki* (canídeos), *T. apodemi* e *T. mackerrasae* (roedores), *T. paradoxura* e *T. sprenti* (mustelídeos), *T. pteropodis* (morcegos) e *T. malaysiensis* (felídeos). Porém, os tradicionais métodos podem ser considerados limitados para uma identificação e diferenciação precisa de espécies especialmente em relação a ovos e larvas. Isso provavelmente levará a questionamentos em relação à análise taxonômica do gênero (Gasser et al., 2006).

A diversidade genética é reconhecida entre os parasitos e representa importante papel na sobrevivência e adaptabilidade dos mesmos. Uma profunda análise dessa diversidade é aplicável em estudos sobre a biologia, epidemiologia e evolução desses parasitos. Diferentes métodos

como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento de genes parciais ou completos, têm sido usados para análises genéticas (Mikaeilli et al., 2015).

Para ensaios de PCR a escolha da região alvo do DNA apropriada é fundamental para a identificação específica dos parasito. Como diferentes genes evoluem em diferentes níveis, a região escolhida precisa fornecer sequências suficientemente variáveis que permitam a identificação de parasitos nos níveis taxonômicos requeridos (Zhu et al., 2001).

O DNA mitocondrial (mtDNA), devido a altas taxas de mutação fornece grande número de informações filogenéticas, sendo assim fonte valiosa para o teste de hipóteses relativas a relações evolutivas entre nematódeos (Hu et al., 2003).

Toxocara canis tem sido encontrado em gatos, sendo identificado a partir das características morfológicas. Mundim et al. (2004), realizando necropsia em gatos observaram a presença dessa espécie nesses animais. Outros autores como Parsons (1987), Baker et al. (1989), Lee et al. (1993) e Scholz et al.(2003), também identificaram esse parasito em gatos domésticos.

Por muito tempo acreditou-se que a espécie encontrada em gatos na Malásia era *T. canis*, devido às características morfológicas. Somente com a utilização de testes moleculares Zhu et al. (1998) conseguiu demonstrar tratar-se de nova espécie que posteriormente foi denominada como *T. malayiensis* (Gibbons et al., 2001). A identificação e a ocorrência dessa nova espécie, em gatos, podem ter implicações médicas, pois essa pode ser mais uma espécie capaz de produzir Larva *Migrans* Visceral e ou Larva *Migrans* Ocular.

Essa descoberta associada aos relatos de identificação de parasitos hospedeiros-específicos em hospedeiros diferentes dos originais tem levantado dúvidas sobre a identidade específica dos ascarídeos, em várias regiões geográficas, estimulando a caracterização genética das espécies provenientes de carnívoros.

1.1 - Histórico

1.1.1 *Toxocara canis*

Na literatura existem poucas informações sobre a descoberta e descrição de *Toxocara canis*. Originalmente essa espécie foi descrita como *Lumbricus canis* por Werner(1782) após a análise de espécimes encontrados em cão e ficando, posteriormente, conhecida como *Ascaris canis*.

Em 1907 com a criação do gênero *Toxocara* por Leiper, *A. canis* foi considerada a espécie tipo do gênero e portanto, renomeada como *Toxocara canis*.

1.1.2 *Toxocara cati*

Goeze (1782) descreveu um verme de gato que continha grandes aletas cervicais e Schrank (1788) atribuiu a esse helminto o nome de *Ascaris cati*. Zeder (1800) introduziu o nome específico *mystax* para esse parasito, entretanto o anterior, dado por Schrank em 1788, teve prioridade.

O gênero *Toxocara* foi criado por Stiles e Hassal (1905) e em 1907 Leiper criou o gênero *Belascaris*, o qual foi diferenciado dos outros gêneros de ascaridídeos devido à presença do ventrículo na base do esôfago dos parasitos. O autor atribuiu a *Ascaris mystax* a representação desse gênero.

Em 1924 Stiles e Brown confirmaram que o gênero *Toxocara* tinha prioridade sobre *Belascaris* e criaram o nome *Toxocara mystax* para o nematódeo do gato. No entanto, “*cati*” é preferido em relação a “*mystax*”, fazendo com que a espécie fosse padronizada como *Toxocara cati*.

1.1.3 *Toxocara malaysiensis*

Rhode (1962) e Lee et al. (1993) reportaram a ocorrência de ascaridídeos encontrados em gatos na Malásia e os identificaram como *T. canis*, devido às semelhanças na morfologia.

Exames microscópicos de um espécime macho imaturo revelaram, no entanto, inconsistências com descrições de *T. canis* publicadas, e uma coleção de ascaridídeos de gatos de Kuala Lumpur, Malásia foi iniciada.

Estudos moleculares do material resultante indicaram que esse parasito era geneticamente diferente de *T. canis* e de *T. cati* (Zhu et al., 1998), sendo considerado uma nova espécie atribuída ao gênero *Toxocara* (Stile, 1905) e designada como *Toxocara* sp. cf. *canis*.

Em estudo posterior Gibson et al. (2001) detalharam a morfologia de 26 helmintos, sendo que 11 deles haviam sido, anteriormente, utilizados nos estudos moleculares de Zhu et al. (1998). Dessa forma os autores observaram que esses espécimes são morfologicamente distinguíveis dos espécimes das outras espécies do gênero. A partir desse entendimento atribuíram a essa espécie o nome de *Toxocara malaysiensis*, devido ao lugar de encontro dos primeiros exemplares.

1.1.4 *Toxascaris leonina*

Rudolphi (1809) descreveu um ascaridídio proveniente do intestino de um leão e o nomeou como *Ascaris lepdoptera*. Pela descrição era possível ver que a espécie apresentava

aletas cervicais estreitas. Leões são parasitados por *Toxocara cati* e *Toxascaris leonina* os quais podem ser diferenciados pelo formato das aletas.

Provavelmente, essa era a mesma espécie por Linstow (1902) como *Ascaris leonina*, inclusive proveniente também de leão.

O gênero *Toxascaris* foi estabelecido por Leiper (1907) devido à presença de aletas semelhante a dos ascaridídeos, porém com ovos de cascas lisas e sem o ventrículo esofágico comum aos outros gêneros.

Railliet e Henry (1911) aceitaram *Ascaris leonina* como a espécie tipo do gênero e acrescentaram outras duas, *Toxascaris limbata* de cão e *Toxascaris microptera* de lobo. A primeira foi considerada espécie nova, enquanto a segunda foi identificada como a espécie descrita por Rudolphi em 1809, após avaliar o exemplar original provenientes do museu de Viena.

Leiper também reexaminou *T. microptera* e concluiu que o parasito era idêntico ao *T. leonina* e pela lei da prioridade, esse foi o nome que prevaleceu. O mesmo ocorreu para *T. limbata*, que anos mais tarde foi considerado sinônimo de *T. leonina*, pois os espécimes foram considerados idênticos aos encontrados em leões e lobo, embora tivessem hospedeiro diferente.

1.2 Morfologia

Os ovos pertencentes ao gênero *Toxocara* são subglobulares, de cápsula espessa e rugosa, com dupla membrana e medem aproximadamente 85-90x 75 micrômetros - *Toxocara canis* e/ou 65-75 micrômetros de diâmetro - *Toxocara cati*/*Toxocara malaysiensis*. Aqueles pertencentes ao gênero *Toxascaris* apresentam as mesmas características, porém com membrana externa lisa (Figuras 1A e 1B).

Os adultos apresentam corpo cilíndrico, não segmentado, robusto, esbranquiçado e revestido por espessa cutícula quitinosa. O dimorfismo sexual é bem definido com fêmeas maiores do que os machos, os quais possuem bolsa copulatória incompleta com espículos, duplos ou únicos de tamanho variável. Na extremidade anterior do parasito observam-se três lábios bem definidos e expansões cuticulares, denominadas asas ou aletas cefálicas, que possuem forma e tamanhos diferentes de acordo com a espécie, sendo ferramenta de identificação pela microscopia estereoscópica (Figura 2).

A extremidade anterior do *T. canis* adulto é elíptica em função das aletas cefálicas que são estreitas e semi-lanceoladas (Figura 3A). Os machos medem entre 4 e 10cm, a cauda apresenta pequeno processo digitiforme na extremidade além de espículos, ligeiramente

desiguais, curvos e alados medindo entre 0,75 e 1,3 mm de comprimento. Os órgãos genitais da fêmea estendem-se anterior e posteriormente à região vulvar e os espécimes medem, aproximadamente, 5 a 18 cm de comprimento (Taylor et al., 2010; Freitas, 1980)

T. cati apresenta aletas cefálicas largas e estriadas e têm formato de seta ou lança (Figura 3B). O corpo do macho mede entre 3 e 6 cm e apresenta, na cauda, apêndice terminal estreito, espículos medindo entre 1.6 e 2.0mm de comprimento e com processo digitiforme. As fêmeas medem entre 4 e 10 cm de comprimento e o aparelho genital apresenta-se, exatamente, como em *Toxocara canis* (Taylor et al., 2010; Freitas, 1980)

T. malaysiensis possui a cutícula estriada transversalmente e as aletas cefálicas são curvadas ventralmente alargando-se gradualmente até a metade do comprimento com posterior afunilamento e estendendo-se por, aproximadamente, um terço do comprimento esofágico (Figura 3C). Os machos têm entre 53 e 84 mm e possui espículos na cauda com ligeira diferença de tamanho (direito: 0.4-0.7mm; esquerdo: 0.4-0.8) e aletas laterais largas. As fêmeas medem entre 110 e 140 mm com a vulva abrindo-se a partir da extremidade anterior cuja fenda está orientada lateralmente (Gibbons et al., 2001)

Os adultos de *T. leonina* têm a extremidade anterior elíptica em virtude da presença das aletas cefálicas, as quais são semelhantes às do *T. canis* (Figura 3D). Os espécimes desse gênero possuem um bulbo esofágico na junção do órgão com o intestino, devido à constrição causada pelo anel ganglionar. O macho mede entre 2 e 7 cm de comprimento, apresentam cauda simples, sem processo digitiforme, com espículos medindo entre 0,17-0,21 mm. A fêmea mede entre 2-10 cm com os órgãos genitais além do nível da vulva (Taylor et al., 2010; Freitas, 1980)

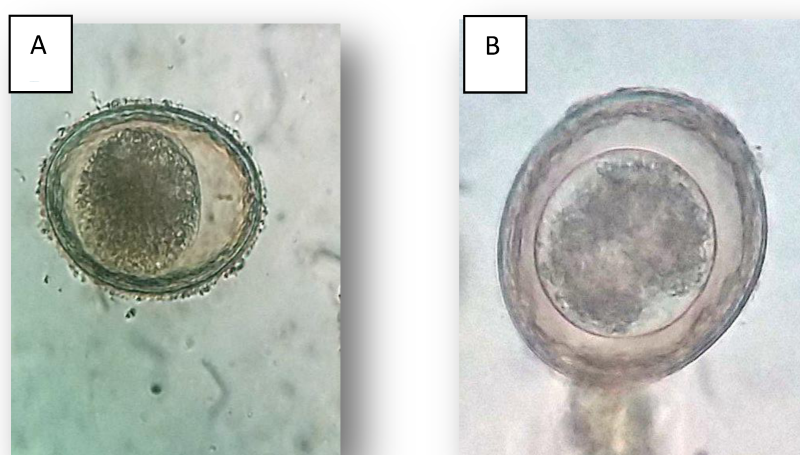


Figura 1 – Ovos de *Toxocara* spp. (A) e *Toxascaris leonina* (B) observados em microscópio óptico em objetiva de 40X e corados com lugol após técnica de centrífugo flutuação em Sulfato de Zinco 33%. Fonte: Acervo da autora



Figura 2 – Espécime adulto de *Toxocara* spp. observado em microscópio estereoscópico. Fonte: Acervo da autora

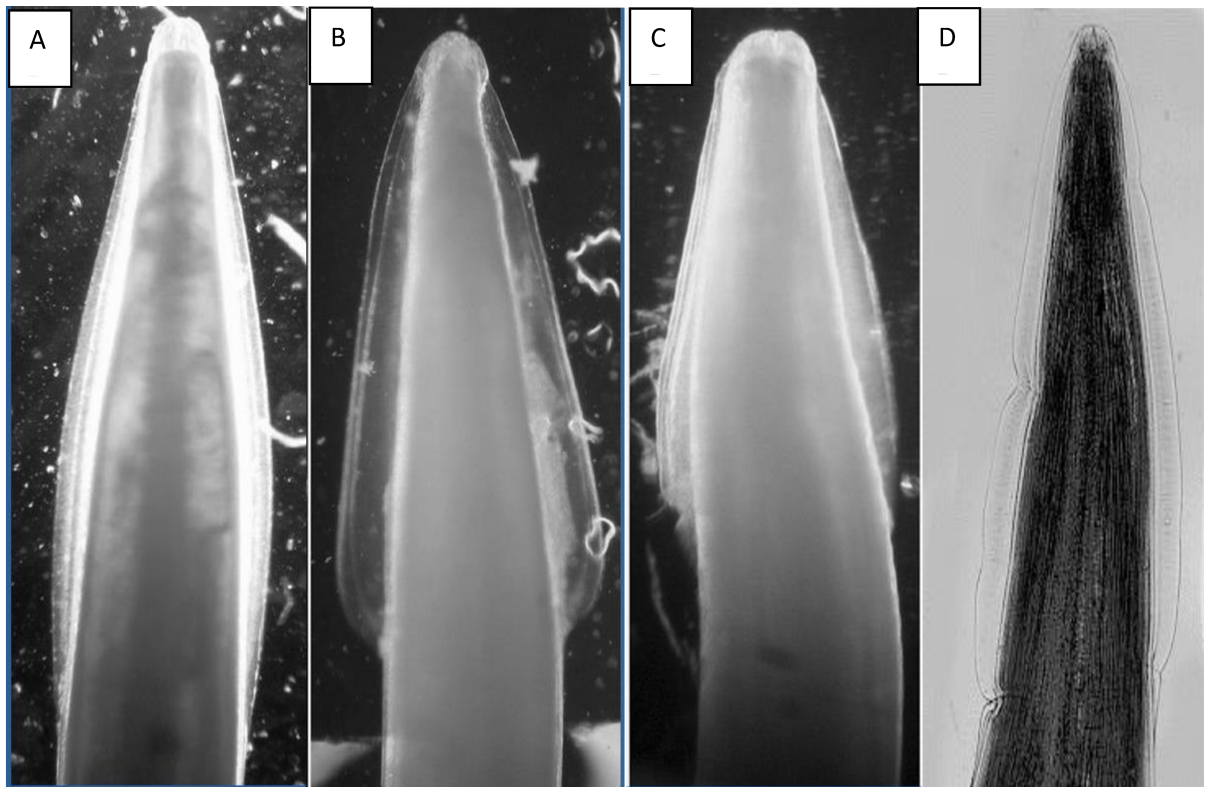


Figura 3 - Extremidade anterior com aletas cefálicas em evidência, de *T. canis*(A), *T. cati* (B), *T. malaysiensis* (C) e *T. leonina* (D).

1.3 Biologia

Os ovos são eliminados nas fezes e o embrionamento ocorre no solo, sob condições favoráveis de temperatura (10°C e 30°C) e umidade. Em média, após 28 dias a larva atinge o estágio infectante (L3) (Taylor et al., 2010; Freitas, 1980). Temperaturas superiores a 37°C aceleram o desenvolvimento, mas também podem causar a degradação do ovo. Assim como temperaturas menores a 10°C são insuficientes para a maturação ou sobrevivência do ovo (Gamboa, 2005).

Os ovos são resistentes e conseguem sobreviver durante o inverno por 12 meses em climas temperados. Em temperaturas amenas e em ambientes úmidos a sobrevivência pode ocorrer por quatro anos ou mais (Azam et al., 2012). O tipo do solo, pH e a porcentagem de cobertura vegetal contribuem para a viabilidade e contaminação ambiental. Solos argilosos impactam negativamente na viabilidade do ovo (Trejo et al., 2012).

Após a ingestão, o ovo, sob ação das enzimas do trato gastro intestinal tem a parede rompida e a larva de terceiro estágio é liberada. Essa penetra e atravessa a parede intestinal, migra pelo corpo do hospedeiro realizando a rota hepato-traqueal e chega ao fígado 24 horas após a infecção. A mudança para quarto estágio ocorre nos pulmões do hospedeiro, 12 horas após as larvas deixarem o fígado. A partir daí, a rota de migração depende de fatores como a idade, condição imune do hospedeiro, e da dose infectante ingerida. No entanto, em condições normais as larvas são deglutidas e retornam, pela traqueia, ao lúmen do intestino delgado onde ocorrem novas mudas, até atingirem o estágio adulto e a maturidade sexual em 7 a 15 dias. (Sprent et al., 1958). Entre quatro a cinco semanas, após esse período, os ovos estarão prontos para serem eliminados, juntamente, com as fezes do hospedeiro (Freitas, 1980).

A larva, também, é capaz de retornar ao sistema circulatório pela penetração nos alvéolos, o que a torna novamente capaz de invadir tecidos somáticos (Sprent, 1956; Webster 1958b).

A transmissão de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. ocorre, principalmente, pela ingestão de ovos viáveis e embrionados, entretanto outras formas de infecção podem ocorrer. Larvas presentes nos tecidos dos hospedeiros paratênicos vertebrados e invertebrados e transmissões transplacentária (*T. canis* e *T. cati*) e transmamária (*T. cati*) são, também, citadas na literatura como fontes de infecção (Overgaauw e Van Knapen, 2013).

Vertebrados como roedores, pássaros e porcos podem servir como hospedeiros paratênicos, para esses helmintos. Geralmente, o padrão de migração, nesses animais é

comparável ao que ocorre nos hospedeiros definitivos. Entretanto, acredita-se que a distribuição larval seja influenciada, diretamente, pela espécie do parasito. Comumente os ovos eclodem, liberando as larvas que migram pelos tecidos, realizando a rota hepato-traqueal (Sprent et al., 1952). As larvas encapsuladas permanecem em latência, nos tecidos, por extensos períodos de tempo mantendo-se viáveis por até 10 anos (Oryan et al., 2010; Taira et al., 2011). Quando os hospedeiros paratênicos são ingeridos, pelos hospedeiros definitivos, as larvas são reativadas, passam por mudas na parede do estômago e intestino delgado, até tornarem-se adultas e continuarem o ciclo biológico (Strube et al., 2013).

Filhotes de cães são infectados no útero, pela reativação de larvas somáticas da mãe a partir do 42º dia da gestação. Essa rota eficiente de transmissão resulta em excreção de ovos aproximadamente 16 dias após o parto (Lloyd 1993). Para filhotes de gatos, a eliminação de ovos inicia-se aproximadamente 47 dias após o nascimento. De forma mais limitada, a transmissão lactogênica continua a ocorrer por cinco semanas (Overgaauw & van Knapen, 2013).

As infecções pré-natais as larvas se mobilizam três semanas antes do parto e migram para os pulmões, local no qual ocorre muda de L3 para L4, pouco antes do parto. No cão recém-nascido o ciclo se completa quando as larvas retornam ao intestino, via traqueia, onde tornam-se adultas. A cadela infectada abriga larvas suficientes para infectar todas as ninhadas subsequentes, mesmo que nunca mais adquira a infecção. Na infecção pela via lactogênica não há migração larval no filhote, sendo o ciclo direto e no intestino (Taylor et al., 2010).

T. canis e *T. cati* apresentam afinidade pelo sistema nervoso central humano, sendo os olhos e o cérebro os órgãos mais atingidos, entretanto, o *T. cati* parece migrar mais lentamente que *T. canis* (Glickman and Summers, 1983; Akao et al., 2003).

Pesquisas têm sugerido que a diferença de tamanho entre as duas espécies pode ser uma das explicações para a grande neuroafinidade apresentada pelo *T. canis*. Como as larvas de *T. cati* são menores, elas seriam capazes de sair facilmente das artérias, enquanto as de *T. canis*, devido ao tamanho maior, seriam menos propensas a deixar o sistema circulatório, ficando retidas no cérebro (Hamilton et al., 2006; Chieffi et al., 2009).

Estudos sobre formas alternativas de transmissão de *T. malaysiensis* e *T. leonina* são escassos na literatura, entretanto devido às semelhanças morfológicas e genéticas com *T. canis* e *T. cati* supõe-se que os mecanismos se assemelhem.

1.4 Aspectos clínicos e sintomatologia da Toxocaríase

Os sintomas clínicos dependem da idade do animal, carga parasitária, localização do parasito no corpo do hospedeiro e do estágio de desenvolvimento dos helmintos, sendo os

animais com até seis meses de idade os mais afetados pela doença (Sprent, 1956). Como em todos os casos de helmintoses a diarreia, constipação, vômito e descarga nasal podem ser observados (Parsons 1987).

Infecções intensas em filhotes de canídeos e felídeos podem resultar em abaulamento do abdômen, déficit nutricional, perda de peso, podendo, em alguns casos, levar à morte (Overgaauw & van Knapen, 2013) principalmente nos casos de obstrução dos ductos biliares e pancreáticos pelas larvas (Parsons, 1987).

A infecção pré-natal parece ser responsável por nascimentos prematuros e abortos (Scothorn, 1965). Após o nascimento podem apresentar pneumonia associada à migração traqueal e obstruções no trato digestivo resultantes da presença do parasito no estômago e intestino (Overgaauw, 1997) que podem levar a morte em até três dias.

Em gatos, por ser a transmissão transmamária a fonte primária de infecção, a rota traqueal não é comum. A maturação dos parasitos leva mais tempo nos gatos do que nos cães, o que poderia ser suficiente para que esses animais desenvolvessem melhores condições corporais antes da doença se instalar. Por essas razões os sintomas clínicos, usualmente, são inaparentes (Overgaauw, 1997).

As infecções são comuns em filhotes jovens com idade inferior a seis meses. Após essa idade há o desenvolvimento da imunidade adquirida, conhecida como teoria da idade-resistente, a qual sugere que com o aumento da idade do animal, as larvas teriam dificuldade em transformarem-se em adultos e a migração somática aumentaria (Greve 1971). Essas larvas poderiam ficar em latência enquanto a imunidade adquirida atuasse. Entretanto, na quebra do equilíbrio parasito/hospedeiro em situações com prenhes e lactação, por exemplo, as larvas seriam reativadas, indo para a placenta e glândulas mamárias pela corrente sanguínea.

A contribuição significativa da imunidade adquirida é extensivamente demonstrada em vários estudos (Barriga, 1988). O mecanismo de resistência em animais mais velhos, provavelmente, ocorre parcialmente dentro dos pulmões, talvez como resposta tardia à hipersensibilidade (Oshima, 1976)

Nos humanos, considerados hospedeiros paratênicos, o quadro clínico pode variar de assintomático a fatal sendo dependente de fatores como a carga parasitária, idade do indivíduo, padrão de migração larval e resposta imune do hospedeiro.

Nos casos sintomáticos a doença é dividida em quatro tipos distintos denominados de: Larva *migrans* ocular (LMO), Larva *migrans* visceral (LMV), Neurotoxocaríases (NT) e “Covert” toxocaríase(CT) (Magnaval et al.,2001; Chen et al.,2012). O amplo espectro das

consequências clínicas e patológicas da toxocariase humana, assim como, frequentes infecções inaparentes, podem causar dificuldade na identificação e classificação de casos clínicos.

LMO é caracterizada por resposta imune eosinofílica à migração da larva dentro do olho; ocorre predominantemente de forma unilateral (Taylor, 2006) e pode causar desde prejuízo visual, estrabismo, leucocoria, descolamento de retina, endofitalmite e uveíte até glaucoma secundário e cegueira (Despommier, 2003).

LMV afeta, principalmente, crianças menores de cinco anos (Worley et al., 1984) as quais podem apresentar febre, aumento e necrose do baço e fígado, sintomas respiratórios como broncoespasmos e asma, eosinofilia e hipergamaglobulinemia. Com o agravamento da doença quadros clínicos como Miocardite (Prunier et al., 2001) e Nefrite (Shetty e Aviles, 1999) podem surgir.

Existem na literatura poucos casos descritos de NT, entretanto existem relatos que as manifestações são variáveis de acordo com as condições do hospedeiro, mas de modo geral o envolvimento do Sistema Nervoso Central pode gerar dores de cabeça, fotofobia, convulsões, aparecimento de sintomas neuropsiquiátricos, epilepsia e encefalite (Bachli et al., 2004; Finsterer & Auer 2007).

Manifestações sutis da doença podem ser resposta ao longo tempo de exposição às larvas migrantes. Esse quadro conhecido como “Covert” toxocariase ou forma oculta da doença varia entre a falta de sintomas (Tariq et al., 1997; Shargi et al., 2001) a sintomas inespecíficos, tais como dor abdominal recorrente, cefaléia, astenia, e hepatomegalia. A eosinofilia pode estar ausente, apesar de altos títulos sorológicos para *Toxocara* spp (Overgaauw, 1997a).

1.5 Métodos diagnósticos

Nos hospedeiros definitivos, canídeos e felídeos, o diagnóstico para *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. é, rotineiramente, feito pela visualização dos ovos presentes nas fezes dos animais positivos, por microscopia, após técnicas qualitativas que utilizem gradientes de diferentes densidade. (Macpherson, 2013). Essas são sensíveis para diagnóstico nos animais com grande eliminação de ovos, entretanto naqueles com pouca proporção e/ou eliminação intermitente de ovos não apresentam confiabilidade (Macpherson, 2013).

Em humanos, as lesões causadas por *Toxocara* spp. na LMV e na LMO são detectadas por várias técnicas de imagem, tais como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética. As lesões diferem-se de nódulos metastáticos por causa das margens distorcidas, do tamanho uniforme e da forma não esférica (Lim, 2008). Biópsia e exames histopatológicos usando técnicas especiais de coloração podem levar ao diagnóstico definitivo (Parsons et al.,

1986). O método diagnóstico mais utilizado são as análises sorológicas, principalmente “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA), que apresenta aproximadamente 78% de sensibilidade e 92% de especificidade (Queiroz et al., 2005) e “Western blot” (de Savigny et al., 1979; Magnaval et al., 1991).

O diagnóstico da NT é o mais difícil e deve incluir além da sorologia tradicional a análise do fluido cérebro espinhal para detecção de anticorpos anti-*Toxocara spp.* e eosinófilos (Finsterer e Auer, 2007).

Resultados de ELISA devem ser interpretados cuidadosamente, pois reações cruzadas com outros parasitos podem ocorrer. Pacientes com LMO podem apresentar titulações negativas, apesar da existência da doença, o que pode ser devido à pequena quantidade de larvas associadas ao longo intervalo entre a infecção e o teste diagnóstico (Overgaauw, 1997).

Técnicas moleculares baseadas na identificação do DNA do parasito no corpo do hospedeiro, não são usualmente aplicados no diagnóstico da Toxocaríase humana e animal, principalmente devido ao alto custo de execução, no entanto são fundamentais na diferenciação das espécies infectantes, o que não ocorre na sorologia.

1.6 Prevalência

Apesar de ser helmintíase prevalente em regiões tropicais, e a mais prevalente nas Américas, com distribuição mundial a Toxocaríase animal é subestimada (Fialho e Corrêa, 2016).

No mundo a maioria dos trabalhos reporta prevalência entre 1 a 60% de *T. canis* nos cães (Willingham et al., 1996). Levantamentos em vários países da Europa reportaram entre 4-6% na Espanha, 16-17% na Polônia e 27-81% na Bélgica, Alemanha, Áustria, Suíça e Irlanda (Rodriguez – Carbonell, 1998; Criado-Fornélio et al., 2000; Gundlach et al., 1999; Luty et al., 2001; Losson et al., 1997; Pfeiffer et al., 1997; Lassnig et al., 1998; Hofer et al., 2000). No Iran e Argentina pesquisas relataram índices de positividade de 6 e 16,3% respectivamente (Dalimi et al., 2006; Soriano et al., 2010).

Infecções por endoparasitos são menos estudadas em gatos do que em cães, porém existem relatos sobre a prevalência de infecções patentes de *T. cati* em gatos indicando que esses animais são responsáveis por parte considerável da contaminação ambiental por esse parasito zoonótico (Fisher, 2003).

Nijse et al. (2016) observaram 7,2% de positividade em gatos na Holanda. Na Alemanha Barutzki e Schaper (2003), Barutzki e Schaper (2011) e Gates e Nolan (2009) relataram índices variando entre 4,7-6,3%. Na Bélgica e na Dinamarca as taxas de positividade atingiram os 60 e

79% respectivamente (Vanparijs et al., 1991; Engbaek et al., 1984). No Iran 44% dos gatos do norte e 42% dos gatos do sul apresentaram-se positivos (Sharif et al., 2010; Zibagi et al., 2007).

Existem poucos estudos sobre a prevalência de *T. malaysiensis* no mundo, entretanto, um estudo em Kuala Lumpur encontrou esse parasito em 11% dos gatos domésticos analisados (The Center for Food Security and Public Health, 2016).

A prevalência de *T. leonina* é menos relatada na literatura do que as de *T. canis* e *T. cati*. A positividade em cães em países da América do Sul, Europa e Ásia variou entre 0,6 e 32% (Soriano et al., 2010; Dubna et al., 2007; Xhaxhiu et al., 2011; Szabova et al., 2007; Dalimi et al., 2006) e entre 0 e 12,9% em gatos nos países da Europa e da Ásia (Mircean et al., 2010; Sharif et al., 2010; Zibagi et al., 2007).

No Brasil não existem levantamentos amplos em relação a positividade desses parasitos em canídeos e felídeos. Nos países existentes, os estudos são regionais e não são específicos relacionando a presença de outros endoparasitos nesses animais. Em Londrina, no estado do Paraná *T. canis* foi observado em 44,3% dos cães analisados (Chieffi e Muller, 1976), índices menores, de 18,9% e 9,3% foram encontrados por Labruna et al. (2006) e Scaini et al. (2003) respectivamente. Em gatos, o único trabalho disponível relata prevalência de 25,2% para *T. cati* e 11,9% para *T. leonina* (Labarthe et al., 2004).

Análises sorológicas sugeriram que a positividade para Toxocaríase humana em países industrializados é de 0,7% na Nova Zelândia, 1,6% no Japão, 2,4% na Dinamarca, 7,5% na Austrália, 14% nos Estados Unidos e 15% na Polônia (Jarosz et al., 2010; Fan et al., 2013).

Maiores taxas têm sido reportadas em países menos desenvolvidos e tropicais nos quais observaram-se soropositividade entre 30 a 93% (Smith e Noordin, 2006; Liao et al., 2010; Roldan et al., 2010; Schoenardie et al., 2013).

Entre humanos, no Brasil a maioria dos trabalhos publicados relata prevalência que varia entre 4,2% a 65,4%, sendo a região norte do país a mais prevalente (Fialho e Corrêa, 2016).

1.7 Potencial zoonótico

O papel zoonótico de *T. canis* é reconhecido, entretanto o mesmo não acontece para *T. cati* (Fisher, 2003) embora haja similaridades no modo de infecção e esses dois helmintos compartilhem grande número de frações antigênicas (Cardillo et al., 2009).

Até pouco tempo a maioria das infecções humanas era atribuída ao *T. canis*. Entretanto, análise dos epítomos e dos antígenos secretados pelas duas espécies revelou homologia psicoquímica e imunológica suficientes para que nos testes sorológicos básicos não haja diferença nos resultados (Kennedy et al., 1987).

Para corroborar a idéia de que ambos os parasitos têm a mesma capacidade de infectar, se estabelecer e causar patologia em humanos, estudos vêm revelando, com frequência, que a maioria dos ovos encontrados em solos contaminados é de *T. cati* e não de *T. canis* (Matsuo e Nakashio, 2005). Além disso, em países islâmicos onde cães são evitados, por motivos religiosos, e os gatos são, preferencialmente, os animais de estimação, a soroprevalência de toxocaríase humana apresenta níveis consideráveis (Smith e Noordin, 2006).

Fischer (2003) estudando pacientes com LMO observou que alguns tiveram maior reação ao antígeno de *T. cati* do que ao de *T. canis* no teste de Oucetrlony. Esses resultados reiteraram a idéia de que *T. cati* pode estar mais relacionado a casos humanos, em especial da LMO, do que se pensava anteriormente. Nesse mesmo estudo, o pesquisador relata que esse parasito foi implicado em pelo menos um caso de LMV.

Alguns pesquisadores acreditam que *T. malaysiensis* apresenta o mesmo potencial zoonótico do *T. canis* e *T. cati*, devido às semelhanças morfológicas e moleculares (Le et al., 2016) porém, não existem trabalhos que comprovem essa questão.

Infecções experimentais com *T. leonina* (com ovos provenientes de canídeos e felídeos) foram originalmente estabelecidas em modelos murinos por Sprent (1959) demonstrando que esse parasito pode infectar hospedeiros paratênicos. Entretanto, o papel na patogênese humana permanece desconhecido, particularmente devido a não diferenciação das espécies pelas técnicas sorológicas. Tem sido sugerido que o potencial zoonótico de *T. leonina* é limitado pois a migração somática não ocorre e a larva não é transmitida verticalmente (Gasser et al., 2006).

1.8 Especificidade de hospedeiro

Uma boa estratégia evolucionária é ter um mecanismo eficiente de dispersão aliado a habilidade de se reproduzir em diversas espécies. Entretanto, *T. canis* e *T. cati* são considerados parasitos exclusivos de canídeos e felídeos, respectivamente e até hoje poucos autores contestaram a especificidade de hospedeiro dessas espécies.

Roth e Schneider (1971) encontraram espécimes adultos de *T. canis* no intestino de gatos adultos necropsiados. Bhowmick (1964) relatou o estabelecimento de infecções patentes experimentais por *T. canis* em gatos. De forma similar Fahrion et al. (2011) observaram a eliminação de ovos de *T. canis*, repetidamente, nas fezes de gatos que haviam sido transferidos para gaiolas, anteriormente utilizadas por cães infectados.

Achados de cães infectados por *T. cati* são mais comuns, havendo vários relatos como o de Mundim et al. (2004) que realizaram necropsia em gatos e observaram a presença do adulto dessa espécie nesses animais. Outros autores como Parsons (1987), Baker et al. (1989), Lee et al.

(1993) e Scholz et al.(2003) identificaram ovos desse parasito em gatos domésticos. O fato de esses animais eliminarem ovos de *T. canis* nas fezes é explicado pela coprofagia, hábito considerado comum para cães. Portanto, a eliminação seria simplesmente resultado da passagem intestinal de fezes contendo esses ovos (Fahrion et al., 2011).

Apesar de todos esses relatos, nenhuma explicação foi atribuída, e os eventos parecem ser considerados excepcionais.

Só existem registros de *T. malaysiensis* em felídeos. No entanto, questiona-se se devido às semelhanças moleculares com *T. cati* esse parasito não seja também capaz de parasitar outros grupos animais.

1.9 Biologia Molecular

Devido a limitações inerentes das técnicas tradicionais de identificação morfológica, vários ensaios a partir do DNA, em especial as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm sido desenvolvidos e utilizados para identificação e diagnóstico (Gasser et al., 2006).

A PCR é amplamente usada para diagnóstico e para aplicações analíticas, pela capacidade de amplificar DNA rapidamente a partir do parasito em qualquer proporção (Gasser et al., 2006). Na identificação realizada por essa técnica a região alvo ou o marcador genético é de importância para o sucesso da metodologia. Diferentes genes necessitam de diferentes padrões e a escolha do alvo é fundamental para auxiliar na identificação de parasitos no nível taxonômico requerido. DNA ribossomal (rDNA) e/ou DNA mitocondrial (mtDNA) são usados para identificar espécies ou genótipos de parasitos (Gasser et al., 2008).

A primeira e a segunda região espaçadora transcrita interna (ITS-1 e ITS-2, respectivamente) do rDNA tem sido comumente utilizadas como marcadores genéticos para a identificação e diferenciação de espécies de *Toxocara* e outros nematódeos. Utilizando o ensaio baseado nessa região do gene, pesquisadores conseguiram pela primeira vez diferenciar entre si as espécies *T. canis*, *T. cati* (Li et al., 2007). Essa técnica específica de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade e fornece ferramentas moleculares para o diagnóstico e pesquisa da epidemiologia molecular de infecções por *Toxocara* spp. em humanos e animais (Chen et al., 2012).

Zhu et al. (1998) utilizaram as sequências ITS-1 e ITS-2, em nematódeo de gatos procedentes da Malásia, anteriormente descritos, morfológicamente, como *T. canis*. Esse estudo revelou espécie variante desse gênero, ainda não conhecida, a qual foi inicialmente denominada como *Toxocara* spp. cf. *canis* (Zhu et al., 1998). A observação de que o *Toxocara* encontrado em

gatos na Malásia não era o *T. canis*, mas apresentava similaridade genética com o *T. cati*, foi suficiente para concluir que se tratava de espécie distinta, a qual posteriormente foi nomeada de *T. malaysiensis* (Gibbons et al., 2001). *T. malaysiensis*, também, foi observado em gatos da China, confirmando que a utilização de abordagens moleculares é importante na identificação e caracterização de espécies crípticas.

Em adição à análise de sequências do rDNA estudos têm demonstrado que sequências derivadas do genoma mitocondrial têm sido alternativa na investigação de genética populacional, sistemática e filogenia de nematódeos, devido ao alto padrão de mutação frente a genes nucleares (Hu et al., 2004; Hu e Gasser, 2006).

Várias regiões do mtDNA, como citocromo c oxidase 1 (*cox1*), NADH subunidade desidrogenase 1 e 4 (*nad1* e *nad4*) e *atp6* (Li et al., 2008; Mikaeili et al., 2014; Le et al., 2016) têm sido empregadas no estudo de genética de nematódeos. Entretanto, as informações sobre o genoma mitocondrial de vários parasitos socioeconomicamente importantes são limitadas, embora significantes avanços tenham sido feitos. Utilizando esses métodos Zhu et al. (2008) e Liu et al. (2014) caracterizaram o genoma mitocondrial de *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* e *T. leonina*, respectivamente. Essa caracterização fornece rica fonte de material para investigações da epidemiologia, ecologia e genética populacional dos vermes (Gasser et al., 2013).

O emprego do mtDNA em estudos populacionais e evolutivos é importante por esse possuir alta taxa de substituição de bases nitrogenadas e apresentar alteração no tamanho original da molécula, devido à inserções e deleções, principalmente na região rica em A+T. Observa-se também o fato de que translocações de genes codificadores de tRNA parecem ser mais frequentes do que se imaginava, acarretando alterações na ordem gênica entre organismos filogeneticamente relacionados (Arias et al., 2003).

A revolução nas tecnologias moleculares forneceu oportunidades substanciais para exploração de patógenos, elucidando aspectos da epidemiologia, ecologia, evolução e patogênese. Entretanto, o alto custo, algumas vezes, impede o processo, principalmente no campo da ciência veterinária. Por isso o desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de técnicas com o mesmo potencial, no entanto, mais baratas e simples são fundamentais para a manutenção dos estudos.

Estudos de Turcekova e Dubinsky (1996) indicaram o potencial do *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP-PCR) para análise do DNA genômico. Comparado com outros métodos moleculares as vantagens do RFLP-PCR é ser rápida na execução e não necessitar de equipamento especial, além dos utilizados na PCR tradicional (Tan et al., 2016).

A precisão da análise da variação gênica têm importantes implicações na identificação específica e intraespecífica de parasitos, além de ser fundamental para estudos relacionados à organização e função do gene (Zhu e Gasser, 1998).

1.10 Distribuição geográfica e variabilidade intragenotípica

Análises do DNA permitem não só a diferenciação de espécies como também revelam diferenças polimórficas intraespecíficas. Em alguns parasitos essas diferenças ocorrem raramente e em outros refletem considerável variabilidade intrapopulacional (Zhu et al., 2001).

Sequências da região ITS de *T. canis*, *T. cati* e *T. leonina* provenientes de diferentes regiões podem ser encontradas no GenBank (Banco de sequências gênicas do Centro Nacional para Informação Biotecnológica – NCBI) e a análise comparativa dessas espécies, revela que existem variações intrapolimórficas que podem estar diretamente relacionadas ao local de origem.

Para *T. canis* foi demonstrado que a latitude geográfica não desempenha nenhum papel nas diferenças polimórficas estando as sequências quase constantes e pequenas mudanças (0.4%) são, principalmente, inserções e substituições (Fogt-Wyrwas et al., 2012).

T. cati, provenientes de Malásia e *T. leonina* provenientes da Polônia apresentaram variabilidade de 2,9% (Zhu et al., 1998) e 7,2% (Zhu e Gasser, 1998) respectivamente, nas sequências da região ITS, quando comparadas com àquelas originárias da Austrália.

Essas análises, também, foram feitas por Mikaeili et al. (2014) e Li et al. (2008) os quais utilizaram os genes mitocondriais *cox1* e *nad1* e encontraram, em ambos os casos, variações significativas entre sequências provenientes de diferentes regiões geográficas.

Variações intrapolimórficas relacionadas à distribuição geográfica são claros exemplos da evolução do parasito, para adaptarem-se melhor ao ambiente e aos hospedeiros, garantindo a manutenção da espécie.

Dada à distribuição mundial de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. é provável que a diversidade genética exista entre as populações (Jenkins et al., 2011) e embora existam progressos muitas informações permanecem obscuras, o que propicia excelentes oportunidades para futuras investigações utilizando marcadores mais sensíveis, como os mitocondriais.

Justificativa

2. Justificativa

Ascaridídeos têm sido identificados a partir de características morfológicas e locais de predileção em uma determinada espécie de hospedeiro. Entretanto, esses métodos tradicionais apresentam limitações consideráveis na identificação e diferenciação de algumas espécies, o que faz com que surjam questionamentos, especialmente sobre a taxonomia desses parasitos.

O reconhecimento das diferentes espécies de Ascaridídeos é importante, devido às implicações associadas, não somente à sistemática, mas também em relação à biologia populacional e ao comportamento epidemiológico dos parasitos. Essa identificação se torna importante, quando se trata de parasitos potencialmente zoonóticos e que causam síndromes sérias no homem.

Existe diversidade genética não reconhecida entre as populações dos gêneros *Toxocara* e *Toxascaris* e uma análise acurada dessa variação é fundamental para melhor entendimento de todos os aspectos que envolvam a biologia desses parasitos.

Os estudos sobre padrões genotípicos de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. apesar de estarem ganhando visibilidade nos últimos anos, ainda são escassos e fornecem informações, muitas vezes, limitadas à região gênica abrangida pelo estudo. Portanto, pouco se sabe sobre as relações intraespecíficas dos indivíduos provenientes de regiões geográficas diferentes. A especiação é algo plenamente estabelecido e sabe-se que as mudanças começam timidamente pelo DNA.

No Brasil não existem informações sobre os padrões genotípicos das espécies desses dois gêneros. Portanto, além de ser o primeiro estudo a abordar essa questão, o presente trabalho, ao compilar dados de organismos provenientes de três continentes, tenta estabelecer uma visão global sobre a genética desses parasitos. Isso fornecerá informações que possam ser futuramente usadas para a criação, por exemplo, de marcadores genéticos mais específicos e sistemas de detecção mais sensíveis, os quais teriam impacto direto no desenvolvimento de estratégias de intervenção contra infecções humanas e animais.

Objetivos

3. Objetivos

Geral:

Estabelecer relações filogenéticas entre espécimes de *Toxocara canis*, *Toxocara cati*, *Toxocara malaysiensis* e *Toxascaris leoninas* procedentes de diferentes regiões geográficas

Específicos:

- Verificar morfológicamente a identidade específica de parasitos adultos e ovos de ascaridídeos;
- Caracterizar molecularmente os isolados pelas técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de sequenciamento e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP);
- Verificar as diferenças polimórficas intraespecíficas e interespecíficas;
- Determinar a distância evolutiva entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes;
- Observar se as variações intragenotípicas encontradas têm relação com a procedência geográfica do helminto;
- Verificar a especificidade da relação parasito-hospedeiro;
- Comparar os resultados fornecidos pela microscopia óptica e as duas técnicas moleculares;

Metodologia

4. Metodologia

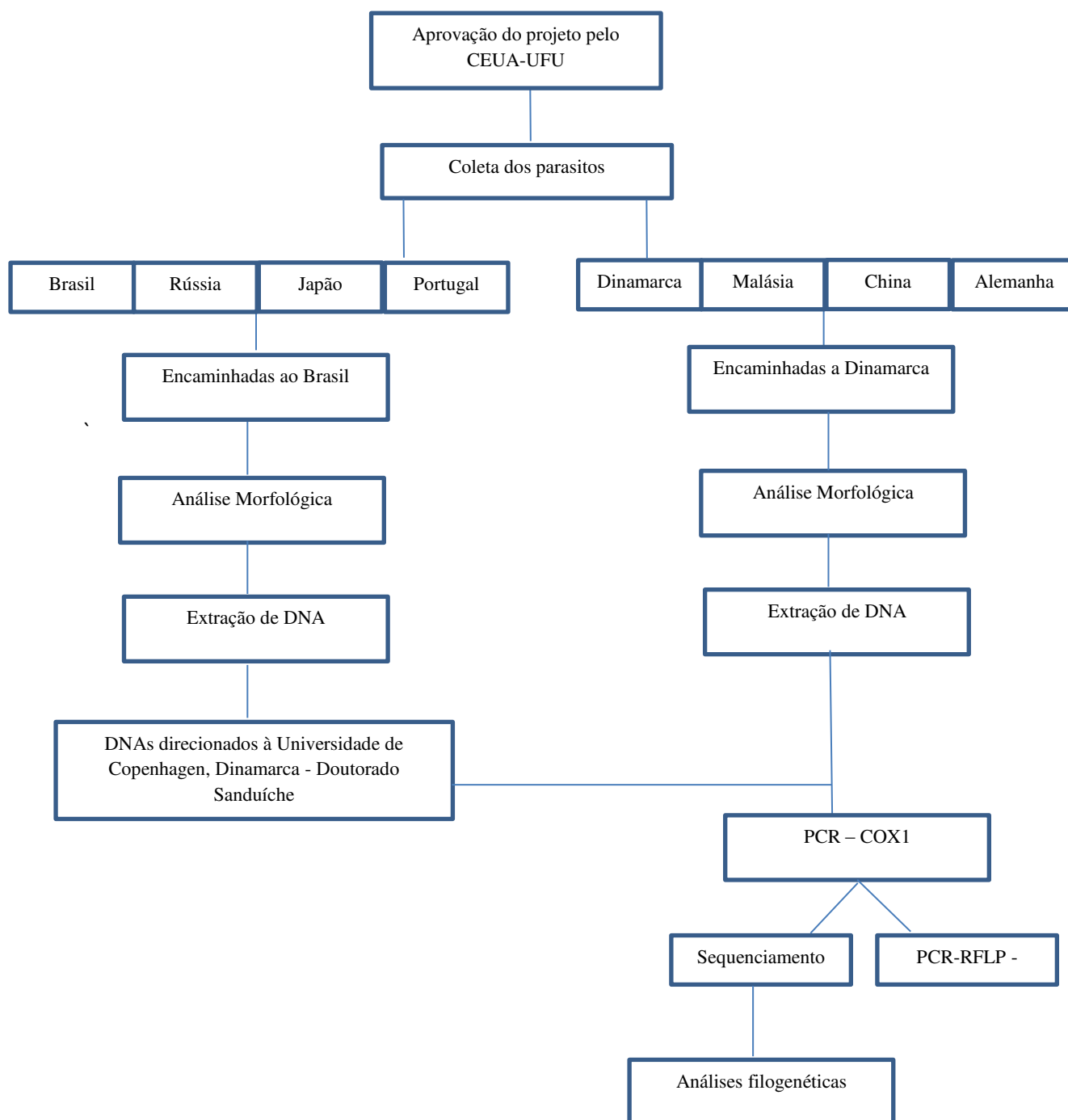


Figura 4 - Fluxograma das etapas do experimento

1. Aprovação ética

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) sob o protocolo 08813.

2. Regiões do estudo

O estudo foi realizado a partir de amostras coletadas em diferentes localidades de oito países, distribuídos em três continentes (Tabela 1).

Os parasitos procedentes do Brasil foram obtidos de duas cidades da região sudeste do país, Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais e Uberlândia, a segunda maior cidade do estado.

Da Europa as amostras foram coletados em Copenhagen e em diversas regiões da ilha da Zelândia na Dinamarca, em Hannover na Alemanha, Moscou, Perm e Yakutia na Rússia e na Cidade do Porto em Portugal.

Na Ásia as amostras foram provenientes de três províncias na China (Jilin, Guandong e Changsha), de Sagamihara no Japão e de Kuala Lumpur na Malásia.

3. População de estudo:

Foram incluídos no projeto parasitos adultos de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. e ovos de *Toxascaris* sp. obtidos de canídeos e felídeo. Os animais eram prodecentes de 47 domicílios, estabelecimentos comerciais, abrigos protetores e reserva conservacionista das regiões citadas, independente da idade, sexo, raça. Os dados demográficos e epidemiológicos dos animais estão descritos na tabela 1.

Ao todo, foram coletadas 438 amostras sendo 434 helmintos adultos e 04 pools de ovos, procedentes de 129 animais (Tabela 2).

Tabela 1 - Perfil epidemiológico e demográfico dos animais dos quais foram obtidos os ascaridídeos analisados nesse estudo

Hospedeiro	ID isolado	Idade	Sexo	Localidade	Origem
Cão	DBRU1	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU2	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU3	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU4	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU5	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU6	6m-1 a	M	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU7	6m-1 a	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU8	6m-1 a	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU9	6m-1 a	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU10	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU11	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU12	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU13	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU14	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU15	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRU16	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU17	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU18	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU19	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU20	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU21	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU22	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU23	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU24	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU25	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU26	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU27	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU28	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Domiciliado
Cão	DBRU29	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU30	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU31	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU32	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU33	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU34	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU35	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU36	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Cão	DBRU37	0-6m	M	Uberlândia-Brasil	Canil
Gato	CBUR38	0-6m	F	Uberlândia-Brasil	Abrigo
Cão	DBRBH1	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DBRBH2	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DBRBH3	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DBRBH4	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DBRBH5	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DBRBH6	0-6m	M	Belo Horizonte-Brasil	Canil
Cão	DDK1	6m-1 a	F	Copenhaga-Dinamarca	Canil
Cão	DDK2	6m-1 a	F	Copenhaga-Dinamarca	Canil
Cão	DDK3	6m-1 a	F	Copenhaga-Dinamarca	Canil
Cão	DDK4	6m-1 a	M	Copenhaga-Dinamarca	Canil
Gato	CDK1	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Canil
Gato	CDK2	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK3	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK4	0-6m	M	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK5	0-6m	M	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK6	0-6m	M	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK7	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK8	0-6m	M	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK9	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK10	0-6m	M	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK11	0-6m	F	Copenhaga-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 39	8 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 41	6 – 12m	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 42	1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 44	1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 45	5 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 46	6-12m	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 48	1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 49	2-3 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 50	10 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 54	4 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 57	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 59	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 61	5 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 62	3 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 65	6 -12m	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK66	1-2 a	M	Zelândia - Dinamarca	Abrigo
					Continua...
Gato	CDK 67	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo

Gato	CDK 69	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 70	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 73	14 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 74	6-12m	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 75	10 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 80	6 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 81	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 82	6-12m	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 83	1 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 85	6 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 87	3 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 88	2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 90	6m-1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 91	6m- 1ª	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 93	3-4 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 96	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 97	6m-1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 100	3 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 104	2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 106	2-3 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 107	0-4m	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 109	1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 110	1 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 111	5 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 113	9 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 120	9 a	F	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 122	1-2 a	M	Zelândia-Dinamarca	Abrigo
Gato	CDK 123	9 a	M	Zelândia-Dinamarca	Domiciliado
Gato	CDK 124	5-6 a	F	Zelândia-Dinamarca	Domiciliado
Gato	CDK 125	5 a	F	Zelândia-Dinamarca	Domiciliado
Gato	CDK 126	1 a	M	Zelândia-Dinamarca	Domiciliado
Gato	CDK 127	6m-1 a	M	Zelândia-Dinamarca	Domiciliado
Cão	DDE1	6m-1 a	F	Hannover-Alemanha	Abrigo
Cão	DDE2	6m-1 a	F	Hannover-Alemanha	Abrigo
Gato	CDE1	1-2 a	F	Hannover-Alemanha	Abrigo
Gato	CML1	1-2 a	M	Kuala Lumpur – Malásia	Abrigo
Cão	DCH1	1-2 a	F	Jilin – China	Abrigo
Cão	DCH2	1-2 a	M	Guangdong – China	Abrigo
Cão	DCH3	1-2 a	F	Changsha – China	Abrigo
Cão	DCH4	1-2 a	M	Changsha-China	Abrigo
Gato	CCH1	1-2 a	F	Guangzhou – China	Abrigo
Gato	CCH2	1-2 a	F	Guangzhou – China	Abrigo
Cão	DJA1	0-6m	M	Sagamihara – Japão	Canil
Cão	DJA2	0-6m	M	Sagamihara-Japão	Canil
Gato	CJA1	1-2 a	M	Sagamihara – Japão	Canil
Gato	CJA2	0-6m	F	Sagamihara – Japão	Canil
Cão	DRU1	0-6m	M	Moscou – Rússia	Canil
Cão	DRU2	0-6m	F	Moscou – Rússia	Canil
Cão	DRU3	0-6m	M	Moscou – Rússia	Canil
Cão	DRU4	0-6m	F	Yakutia – Rússia	Canil
Cão	DRU5	0-6m	F	Yakutia – Rússia	Canil
Cão	DRU6	0-6m	M	Perm – Rússia	Canil
Gato	CRU1	6m-1 a	M	Moscou – Rússia	Canil
Gato	CRU2	1-2 a	F	Moscou – Rússia	Canil
Gato	CRU3	6m-1 a	F	Perm - Rússia	Canil
Leão	CPT1	1-3 a	F	Cidade do Porto - Portugal	Reserva conservacionista
Leão	CPT2	1-3 a	F	Cidade do Porto - Portugal	Reserva conservacionista
Leão	CPT3	1-3 a	F	Cidade do Porto - Portugal	Reserva conservacionista
Cão	DPT1	6m-1 a	M	Cidade do Porto - Portugal	Abrigo

Legendas: ID - Identificação; F – Fêmea; M – Macho ; DBRU – DogBrasil Uberlândia, DBRBH – Dog Brasil Belo Horizonte; DDK – Dog Dinamarca, CDK – Cat Dinamarca; DDE – Dog Alemanha, CDE – Cat Alemanha; CML – Cat Malásia; DCH – Dog China, CCH – Cat China; DJA – Dog Japão; CJA- Cat Japão; DRU – Dog Rússia, CRU – Cat Rússia, CPT – Cat Portugal e DPT – Dog Portugal.

Tabela 2 – Número de amostras coletadas, provenientes de canídeos e felídeos, em cada país incluído nesse estudo

Animais	Países							
	Brasil	Dinamarca	Alemanha	Malásia	China	Japão	Rússia	Portugal
Canídeos	282 (37)*	12 (04)	6 (2)	0	5 (4)	2 (2)	11 (6)	1 (1)
Felídeos	1 (1)	93 (60)	4 (1)	5 (1)	4 (2)	2 (2)	7 (3)	3 (3)
Total	283 (38)	105 (64)	10 (3)	5 (1)	9 (6)	4 (4)	18 (9)	4 (4)

*Números dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais dos quais os vermes foram procedentes.

4. Coleta dos Parasitos

Os adultos e os ovos de ascaridídeos foram obtidos de duas formas: pelas fezes e por necropsia. Todos helmintos de cães, do Brasil, foram obtidos pela administração oral de Sulfato de Piperazina 46% (dose de 45 mg/kg). Após 24 horas os parasitos foram eliminados inteiros juntamente com as fezes dos animais. O único parasito de gato do Brasil foi obtido por necropsia, durante uma aula de patologia na Universidade Federal de Uberlândia, de um animal cuja morte ocorreu por causas naturais.

Os helmintos de cães proveniente de Uberlândia foram coletados pela doutoranda responsável por esse projeto e os de Belo Horizonte pelo Ms. Hudson Andrade dos Santos do Laboratório de Helminologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Todos os helmintos restantes foram coletado por necropsia seguindo as normas estabelecidas por cada pesquisador e/ou instituto de pesquisa.

Os parasitos provenientes da Dinamarca foram coletados e cedidos pelo Prof. Dr. Peter Nejsum, coorientador desse trabalho, e pela doutoranda Nao Takeushi-Storm ambos da Universidade De Copenhagen, Copenhagen, Dinamarca. Os parasitos provenientes da Alemanha, Malásia, China, Japão e Rússia foram cedidos para esse trabalho, respectivamente pelos colaboradores Prof^ª. Dr^ª. Katharina Raue da Universidade de Medicina Veterinária de Hannover, Hannover, Alemanha; Prof. Dr. Xing-Quan Zhu do Instituto Lanzhou de Pesquisas Veterinárias, Província Gansu, China; Prof^ª. Dr^ª. Taira Kensuke da Universidade de Azabu, Kanawaga, Japão e Prof^ª. Dr^ª. Irina Odoevskaya do Instituto de Helminologia Skriabin, Moscou, Rússia.

Os ovos provenientes de cães de Portugal foram eliminados naturalmente com as fezes dos animais, sem nenhum tratamento prévio. As fezes contendo os ovos foram enviadas pela Professora Dra. Teresa Mateus da Universidade do Porto, Cidade do Porto, Portugal.

5. Processamento dos parasitos

Os helmintos adultos e as fezes contendo ovos foram armazenados em recipientes estéreis contendo tampão fosfato salino (PBS). Os coletados no Brasil, Rússia, Portugal e Japão foram encaminhados ao Laboratórios de Sorologia e Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal de Uberlândia – Brasil, e os provenientes de Copenhague, Alemanha, China e Malásia foram direcionados ao Laboratório de Doenças Veterinárias e Biologia da Universidade de Copenhague, onde a doutoranda realizou durante sete meses parte desse projeto pelo programa de Doutorado Sanduíche promovido e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Nos laboratórios, os parasitos foram lavados várias vezes em água destilada, e posteriormente, armazenados em tubos cônicos de 15 mL contendo solução fisiológica. Os tubos foram identificados de acordo com a procedência geográfica, espécie animal, data e forma de coleta, e estocados a 4°C até o momento da análise morfológica, realizada no máximo três dias após a coleta.

As fezes contendo ovos foram submetidas a técnica de centrifugo-flutuação em Sulfato de Zinco 33% (Faust, 1938) para isolamento dos ovos. Os ovos foram recolhidos em tubos de poliestireno de 1.5mL e centrifugados a 10.000xg com PBS. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por três vezes até completa eliminação dos resíduos do sal. O “pellet” de ovos foi armazenado a -20°C para posteriores análises.

6. Identificação morfológica

Os parasitos adultos foram observados em microscópio estereoscópico e as características morfológicas foram utilizadas para identificação específica conforme as chaves de Yamaguti (1961), Vicente et al (1997) e Anderson et al (2009).

Após a identificação, todos os parasitos foram armazenados, individualmente, em tubos de poliestireno e acondicionados a -20° C para posterior extração do DNA.

7. Identificação molecular

7.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído pela técnica da proteinase K/ fenol-clorofórmio modificada (Sambrook et al., 1989). Fragmentos iguais (aproximadamente 0,5cm) de cada parasito adulto foram lavados duas vezes com água destilada. Subsequentemente, 500µL de tampão de lise (100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCL 2%, 0,5% SDS) foram acrescidos à amostra e a mistura foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada em banho-maria por três vezes, cada etapa teve duração de um minuto e meio.

Ao produto líquido foram adicionados 20 µL de proteinase K, com posterior incubação a 56° “overnight”. Posteriormente, 300µl de Fenol e de Clorofórmio foram adicionados e a amostra foi centrifugada a 10000 xg por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida, para a precipitação do DNA, foi adicionado volume igual de Isopropanol (300 µL) e as amostras foram levemente agitadas. Os tubos foram então incubados a -20°C por 18 horas e após isso, centrifugados a 10000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e 500 µl de etanol 70% foram adicionados ao “pellet”. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.000xg por 10 minutos, o etanol descartado e as amostras ficaram em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol . O DNA extraído foi armazenado à -20°C para posterior realização das técnicas moleculares.

Tubos livres de DNA foram incluídos em todas as extrações de DNA como controle negativo do processo.

Os ácidos nucleicos obtidos foram dosados e a pureza das alíquotas foi observada em espectrofotômetro (Nanodrop®).

As amostras cujo DNA foi extraído no Brasil, antes do período de Doutorado Sanduíche na Universidade de Copenhagen, foram enviadas ao Departamento de Biologia e Doenças Veterinárias, seção de Parasitologia e Doenças Aquáticas da Universidade de Copenhagen, Campus Frederiksberg, Frederiksberg – Dinamarca para continuação das análises que ocorreram sob a supervisão do Prof. Dr. Peter Nejsum.

7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Realizada na Universidade de Copenhagen – DK)

Para as reações de amplificação a região da subunidade c oxidase do citocromo mitocondrial 1 (*cox 1*), foi eleita como alvo, e a partir disso, um par de *primers* (TOXCOIF3 e TOXCOIR2), que amplifica sequência de 490 pares de bases, foi desenhado, com o auxílio do programa online Primer3® especificamente para esse estudo (Tabela 3).

As reações foram realizadas em volume final de 20µL contendo 10X PCR Buffer, 0,25mM MgCl²⁺, 4mM dNTP, 10 pmol de cada *primer*, 1U de Taq Polimerase e 90-130 ng de DNA, em termociclador Mastercycler®pro (Eppendorf, Brasil) sob as seguintes condições: 95°C por 15 minutos (desnaturação inicial) seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos (desnaturação), 60°C por 40 segundos (anelamento), 72°C por 1 minuto (extensão) e 72°C por 5 minutos (extensão final). As bandas de interesse foram visualizadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (P/V) corado com Gel Red 10000X (Biotium) e fotografados com a ajuda de software visualizador de gel. Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador *ΦX 174-Hae III* (Promega).

Amostras livres de DNA foram incluídas em todas as reações como controle negativo de contaminação.

Tabela 3 - Primers utilizados nas reações de PCR para amplificação de fragmento do gene *cox1*

Sequência	Fragmento amplificado
5' – GATTTTACCTGCTTTTGGTATTATTAG – 3'	490pb
5' – CCAAAGACAGCACCCAAACT – 3'	

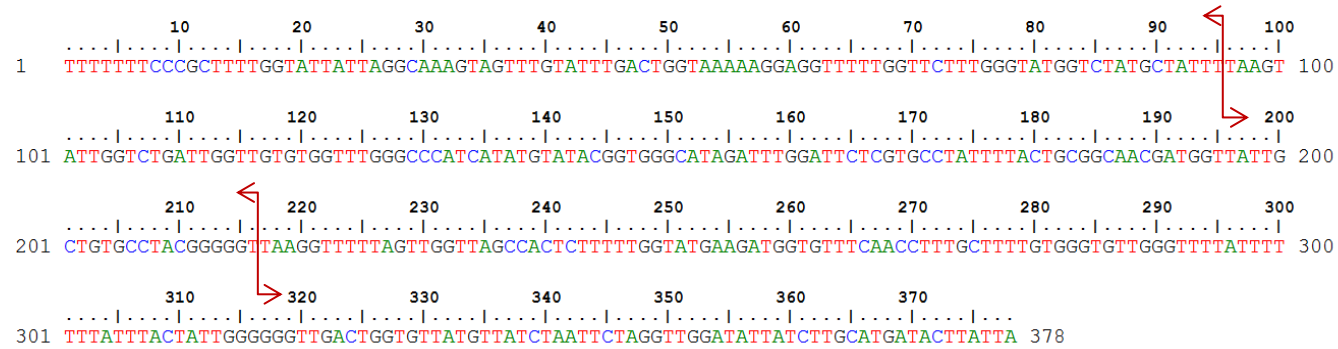
7.3 Sequenciamento (Realizada na Universidade de Copenhaga – DK)

Os “amplicons” obtidos, nas reações de PCR foram enviados imediatamente após as reações para a empresa privada MacroGen, na Coreia do Sul, a qual foi responsável pela purificação e sequenciamento dos fragmentos por eletroforese capilar. Esse é o procedimento padrão adotado pelo Professor Doutor Peter Nejsund, da Universidade de Copenhaga, para todos os sequenciamento de amostras realizados por ele.

7.4 Reações de Restriction Fragment Length Polymorfism (RFLP-PCR)

Para escolha da enzima foi criado um mapa de restrição com o auxílio da ferramenta online NEBcutter® (New England Biolabs) a partir de sequências bases disponíveis no GenBank. Essas promovem a visualização dos pontos de corte da enzima e por consequência, os fragmentos gerados com a restrição (Figuras 5A, 5B, 5C e 5D).

Os produtos das reações de PCR (3 μ L) foram digeridos diretamente com 3 unidades (0.2 μ L) da endonuclease de restrição MseI (New England Biolabs) em 10 μ L por duas horas a 65°C. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 2,0% corado com Gel Red 10000X (Biotium) e fotografado com o auxílio de software visualizador de gel. Para estimativa do tamanho dos fragmentos, foi utilizado o marcador *Φ X 174-Hae III* (Promega).

Toxocara canis**Fragmentos:****95 pb**

5' - TTTTTCCTCCGCTTTGGTATTATTAGGCAAAGTAGTTGTATTGACTGGTAAAAAGGAGGTTTTGGTTCTTTGGGTATGGTCTATGCTATTT - 3'

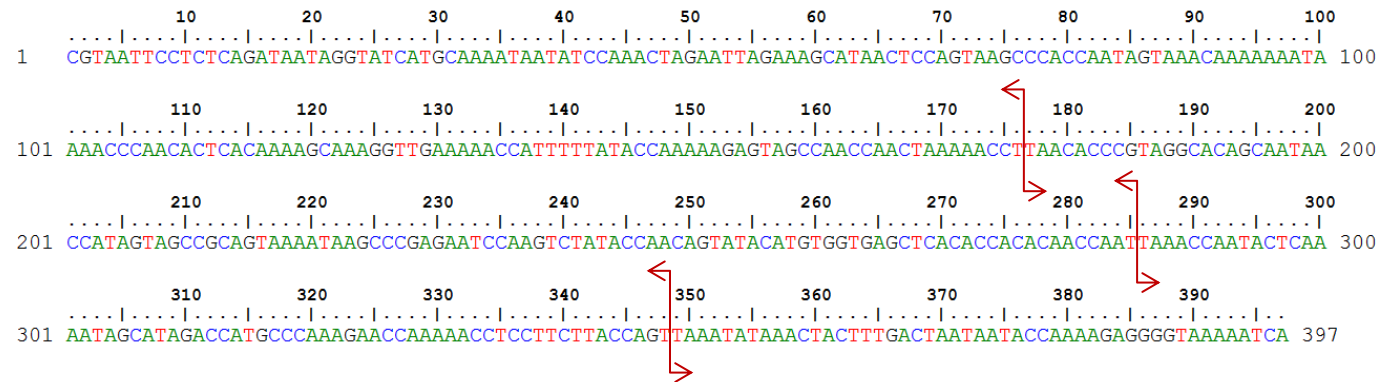
120pb

5' - TAAGTATTGGTCTGATTGGTTGTGGTTTGGGCCCATCATATGTATACGGTGGGCATAGATTGGATTCTCGTGCCTATTTTACTGCGGCAACGATGGTTATTGCTGTGCCTACGGGGGT - 3'

161pb

5' - TAAGGTTTTAGTTGGTTAGCCACTCTTTTGGTATGAAGATGGTGTTCACCTTTGCTTTTGGGGTGTGGGTTTTATTTTTTATTACTATTGGGGGGTTGACTGGTGTATGTATCTAATTCTAGGTTGGATATTATCTTGCATGATACTTATTA - 3'

Figura 5A - Mapa de restrição para *Toxocara canis* feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.

Toxocara cati**Fragments:****176pb**

5'- CGTAATTCCTCTCAGATAATAGGTATCATGCAAAATAATATCCAACTAGAATTAGAAAGCATAACTCCAGTAAGCCCACCAATAGTAAACAAAAAATAAAACCAACTCACAAAAGCAAAG GTTGAAAAACCATTTTTATACCAAAAAGAGTAGCCAACTAAACCT - 3'

109pb

5'- TAACACCCGTAGGCACAGCAATAACCATAGTAGCCGCAGTAAATAAGCCCGAGAATCCAAGTCTATACCAACAGTATACATGTGGTGAGCTCACACCACACAACCAAT - 3'

63pb

5'- TAAACCAATACTCAAAATAGCATAGACCATGCCAAAGAACCAAAAACCTCCTTCTTACCAGT - 3'

49pb

5'- TAAATATAAACTACTTTGACTAATAATACCAAAAGAGGGGTAAAAATCA - 3'

Figura 6B - Mapa de restrição para *Toxocara cati* feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.

Toxocara malaysiensis**Fragmentos:****40pb**

5'- TTTCCCTCTTTTGTATTATTTGTCAGAGTAGTTGTATT - 3'

52pb

5'- TAACTGGTAAGAAGGAAGTTTTGGTTCGTTGGGGATGGTTTATGCTATT - 3'

121pb

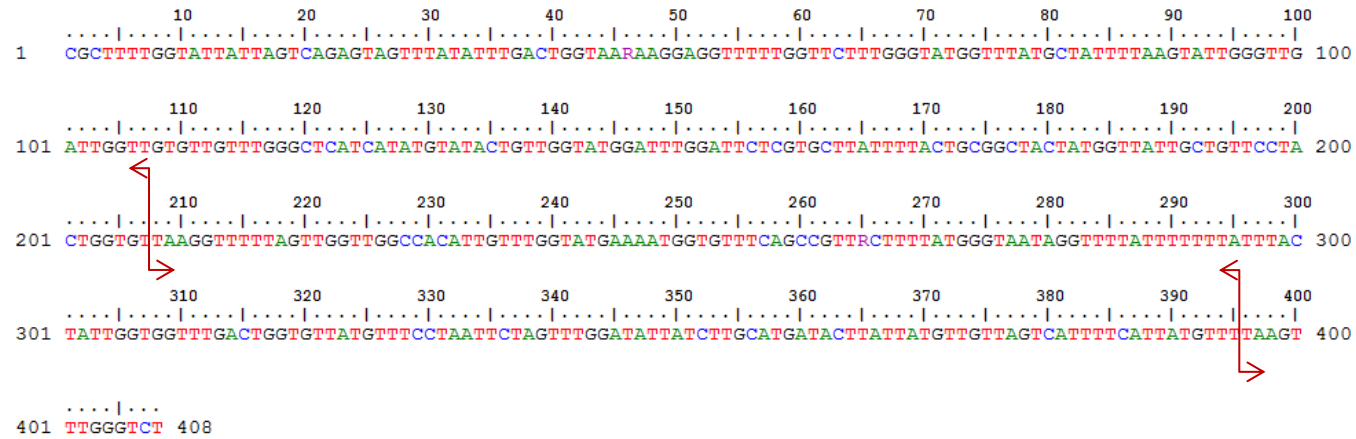
5' - TAAGTATTGGTTTGATTGGCTGTGTGGTTTGGGCTCATCATATGTATACCGTGGGTATAGATTGGATTCTCGGGCTTATTTTACTGCGGCGACTATGGTTATTGCTGTGCCTACTGGTGT - 3'

207pb

5'-TAAGGTTTTAGTTGGTTGGCTACTCTTTTGGTATGAAATGGTTTTTCAGCCTTACTTTTATGGGTGTTAGGTTTTATTTCTGTTTACTATTGGGGCCTTACTGGTGTGATGCTTTCTAATCTAGCCTTGATATTATTTGCATGATACCTAATATACAAATAACTCTGAAAAATAATACAAAAGCAGGTAAATCA - 3'

Figura 7C - Mapa de restrição para *Toxocara malaysiensis* feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.

Toxascaris leonina



Fragmentos:

86pb

5'–CGCTTTTGGTATTATTAGTCAGAGTAGTTATATTTGACTGGTAARAAGGAGGTTTTGGTTCCTTGGGTATGGTTATGCTATTT – 3'

121pb

5'–TAAGTATTGGGTTGATTGGTTGTTGTTTGGGCTCATCATATGTATACTGTTGGTATGGATTGGATTCTCGTGCTTATTTTACTGCGGCTACTATGGTTATTGCTGTTCTACTGGTGT – 3'

188pb

5'–TAAGGTTTTAGTTGGTTGGCCACATGTTTGGTATGAAAATGGTGTTCAGCCGTTTCTTTATGGGTAAATAGGTTTTATTTTATTTTACTATTGGTGGTTGACTGGTGTATGTTTCTTAATTCAGTTTGGATATTATCTTGCATGATACTTATTATGTTGTTAGTCATTTTCATTATGTTT – 3'

Figura 8D - Mapa de restrição para *Toxocara leonina* feito com o auxílio da ferramenta online NEBcutter®. Setas indicam sítio exato de clivagem da enzima MseI.

7.5 Análise filogenética

A qualidade das sequências parciais e a união dos fragmentos sequenciados nas respectivas zonas de intersecção, foram obtidas com o auxílio do programa Sequence Scanner versão 1.0 (Copyright Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O alinhamento dos nucleotídeos foi realizado de forma manual utilizando o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), tomando-se como base sequências disponíveis no *GenBank* (Tabela 4).

Para visualização das relações filogenéticas entre as espécies/genótipos filogramas foram construídos a partir do programa Mega v.5.1 Beta. Para obtenção de resultados fidedignos o método Neighbor-Joining com valores de “bootstrap” estabelecidos em 1000 réplicas foi utilizado.

As distâncias evolutivas entre os pares de sequências originadas nesse estudo foram calculadas pelo método Pairwise disponível no mesmo programa usado para a construção dos filogramas.

Tabela 4 - Número de acesso das sequências disponíveis do GenBank utilizadas como referências para análises filogenéticas nesse estudo

Número de acesso	Espécie	Origem do isolado
AM411108	<i>Toxocara canis</i>	China
AJ920055	<i>Toxocara canis</i>	Holanda
AJ920054	<i>Toxocara canis</i>	Austrália
KC293899	<i>Toxocara canis</i>	Iran
AM411622	<i>Toxocara cati</i>	China
AJ920057	<i>Toxocara cati</i>	China
KC200179	<i>Toxocara cati</i>	Iran
AM412316	<i>Toxocara malaysiensis</i>	Malásia
NC023504	<i>Toxascaris leonina</i>	Austrália
KC293927	<i>Toxascaris leonina</i>	Iran

Resultados

5 Resultados

1. Análise morfológica

Todo o material foi analisado visando a identificação da espécie do parasito, para isso observou-se o formato das aletas e a presença ou ausência do bulbo esofágico. Dos 313 parasitos adultos de cães, 309 (98,7%) foram identificados como *T. canis* (Figura 6) e quatro (1,3%) como *T. leonina* (Figura 7). Dos 123 espécimes adultos provenientes de gatos 118 (95,9%) foram identificados morfológicamente como *T. cati* (Figura 8) quatro (3,2%) como *T. malaysiensis* e um (0,9%) como *T. leonina*. Os ovos, provenientes de leões (n=3) e os de cão (n=1) oriundos de Portugal foram previamente identificados pela colaboradora Prof^a. Dr^a. Teresa Mateus, da Universidade do Porto em Portugal, e confirmados pela, doutoranda responsável por esse projeto, como sendo de *T. leonina* (leões) e *T. canis* (cão) (Figura 9).

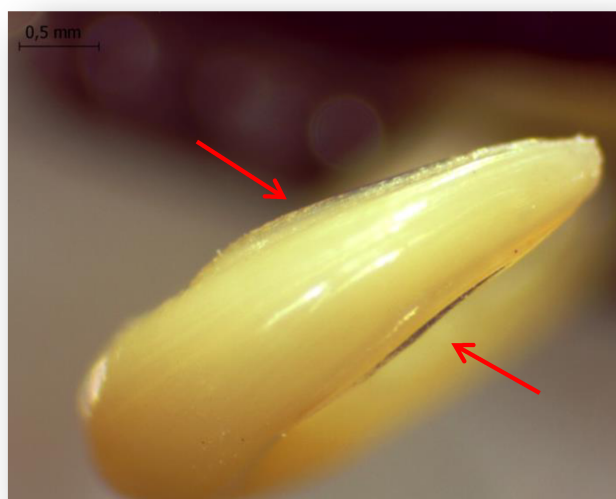


Figura 9 - Extremidade anterior de *Toxocara canis* observada em microscópio estereoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora

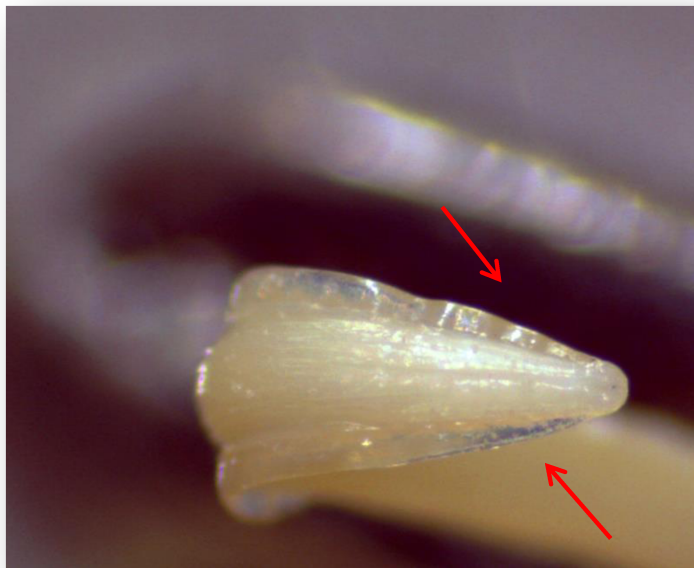


Figura 10 - Extremidade anterior de *Toxascaris leonina* observada em microscópio esteoreoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora

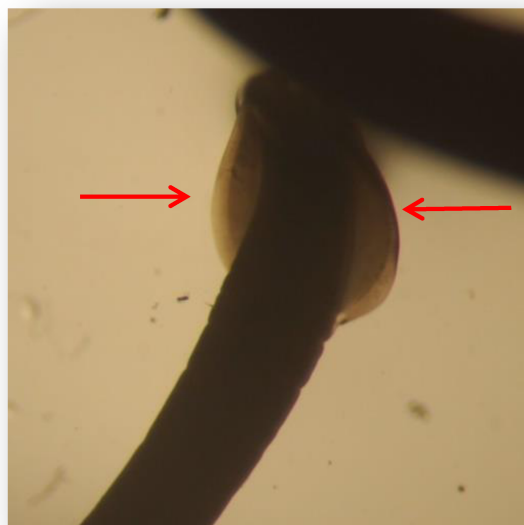


Figura 11 - Extremidade anterior de *Toxocara cati* observada em microscópio esteoreoscópio. Setas indicam as aletas cefálicas. Fonte: acervo da autora



Figura 12 - Ovos de *Toxascaris leonina* observados em microscópio óptico na objetiva de 40X e corados com Lugol. Setas indicam a membrana externa lisa. Fonte: acervo da autora

2. Análises molecular

2.1 PCR

Das 438 amostras analisadas morfologicamente todas tiveram o DNA extraído e foram submetidas a PCR para amplificação de 490pb do gene mitocondrial *cox1*. A reação foi eficiente em 424 amostras (96,8%) (Figura 10).

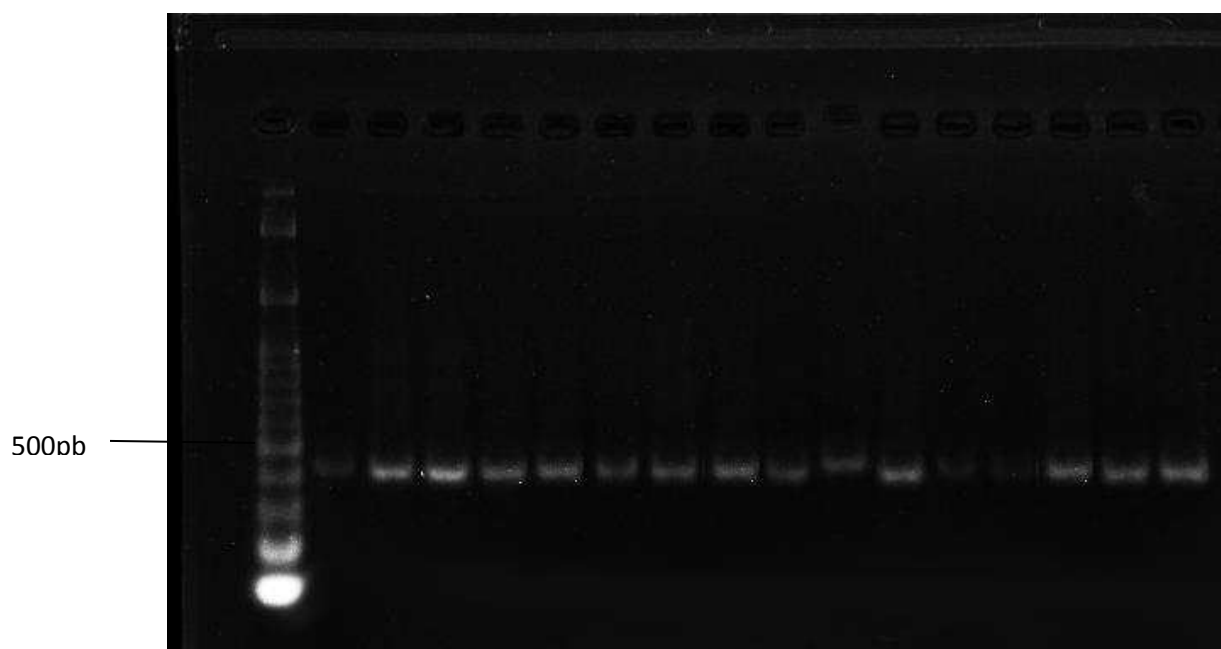


Figura 13 - Fragmentos de 490pb do gene Cox1 em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Marcador de peso molecular - 100pb

2.2 Sequenciamento

Das 424 amostras que obtiveram sucesso na amplificação 72 foram escolhidas para o sequenciamento do fragmento de DNA amplificado. Do Brasil, as amostras foram escolhidas aleatoriamente. Do restante dos países, todas aquelas que foram positivas na PCR, foram submetidas ao sequenciamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Quantidade de helmintos, provenientes de cada país abrangido nesse estudo, (adultos e ovos) submetidos à reação de sequenciamento do fragmento do gene *cox1*

Animais	Países							
	Brasil	Dinamarca	Alemanha	Malásia	China	Japão	Rússia	Portugal
Canídeos	12 (11)*	11 (4)	5 (2)	0	3 (1)	2 (2)	10 (5)	1 (1)
Felídeos	1 (1)	9 (9)	4 (1)	3 (1)	1 (1)	2 (2)	5 (3)	3 (3)
Total	13 (12)	20 (13)	9 (3)	3 (1)	4 (4)	4 (4)	15 (8)	4 (4)

*Números dentro dos parênteses correspondem à quantidade de animais dos quais os vermes foram procedentes.

Do total de amostras sequenciadas (n=72), 21 (29,1%) foram identificadas como *T. cati*, 46 (63,9%) como *T. canis*, duas (2,8%) como *T. malaysiensis* e três (4,2%) como *T. leonina*.

Duas amostras provenientes de gatos (CDK 2_1 e CBRU38_1) apresentaram sequência correspondente a de *T. canis*, e uma proveniente de cão (DRU2_1) foi identificada como *T. cati*.

Das 72 sequências obtidas, nesse estudo, 23 (31,9%) foram idênticas a oito sequências disponíveis no Genbank (Tabela 6); as outras 49 (68,1%) apresentaram identidade gênica entre 96 e 99%. Todas as sequências não idênticas serão depositadas no Genbank no momento da publicação dos respectivos artigos científicos.

Entre os isolados que não tiveram correspondência no Genbank alguns apresentaram sequências idênticas entre si, mesmo sendo provenientes de diferentes hospedeiros, como é o caso dos isolados DDE1_1, DDE1_2, DDE2_2, DDE2_3 e DDE2_4; DDK4_5; DDK4_6; e DDK4_8; CRU3_1 e CRU3_2; LPT1_1, LPT2_1 e LPT3_1. Todos os resultados bem como as relações filogenéticas estão ilustrados na figura 11.

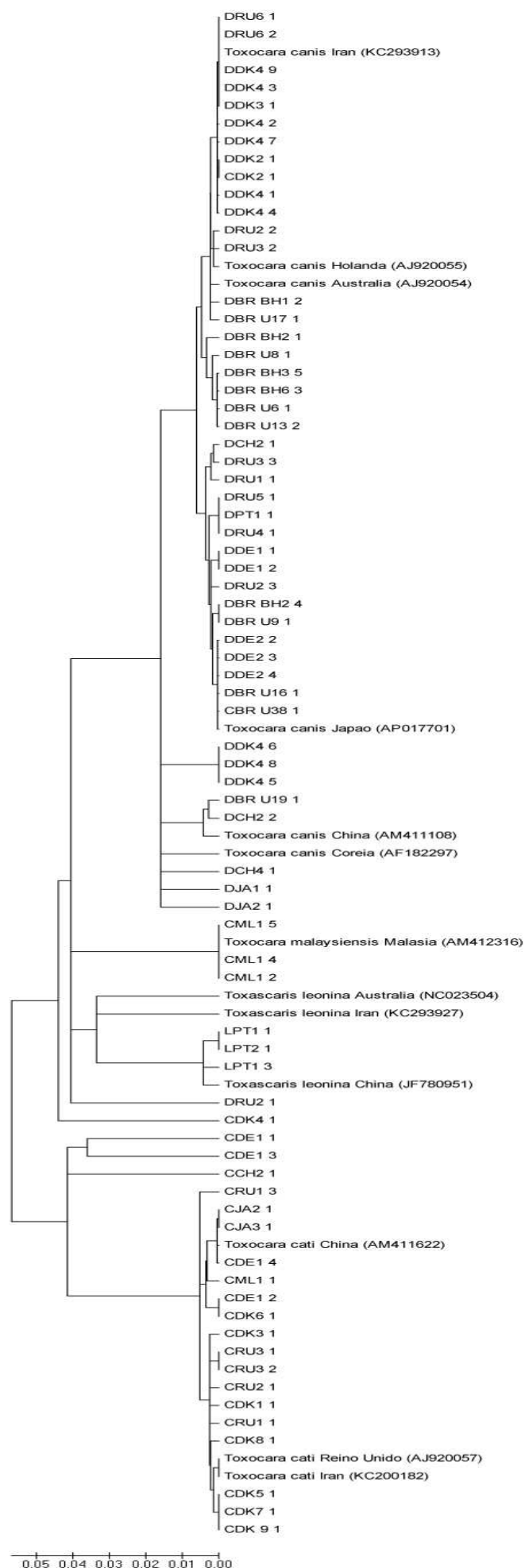


Figura 14 - Relações filogenéticas entre espécimes de *T. canis*, *T. cati*, *T. malaysiensis* e *T. leonina* de diferentes regiões do mundo inferidas a partir de sequencias parciais do gene Cox1 utilizando o método Neighbor-Joining com bootstraps estabelecidos em 1000 réplicas

Tabela 6 - Isolados analisados e número de referências das sequências disponíveis no Genbank homólogas à eles

Isolado	Número de acesso Genbank
DBRU6_1	KC293906
DBRU16_1	KC293911
CBRU38_1	KC293911
DBRBH3_5	KC293906
DBRBH6_3	KC293906
DDK3_1	KC293913
DDK4_1	KC293913
DDK4_2	KC293913
DDK4_3	KC293913
DDK4_4	KC293913
DDK4_9	KC293913
CDK5_1	KC200199
CDK7_1	KC200199
CDK9_1	KC200199
DDE2_2	KC293911
DDE2_3	KC293911
DDE2_4	KC293911
CDE1_4	AM411622
CML1_2	AM412316
CML1_5	AM412316
DCH2_2	LC13353
CJA2_1	KC200192
CJA3_1	KC200192

2.3 RFLP

Todas as 424 amostras que tiveram o fragmento do gene Cox1 amplificado, foram submetidas as reações de RFLP.

Os padrões de restrição observados, mostraram que 351 (75,7%) parasitos (adultos e ovos) eram *T. canis/T.leonina* (95pb, 120pb, 161pb /86pb, 121pb, 188pb) 70 (16.5%) eram *T. cati* (49pb, 63pb, 109pb, 176pb) e três (7.8%) *T. malaysiensis* (40pb, 52pb, 121pb, 207pb) (Figura 12).

Dois helmintos de gato (CDK2_1, CBRU38_1) foram identificados, como *T. canis* e um de cão (DRU2_1) foi identificado como *T. cati*.

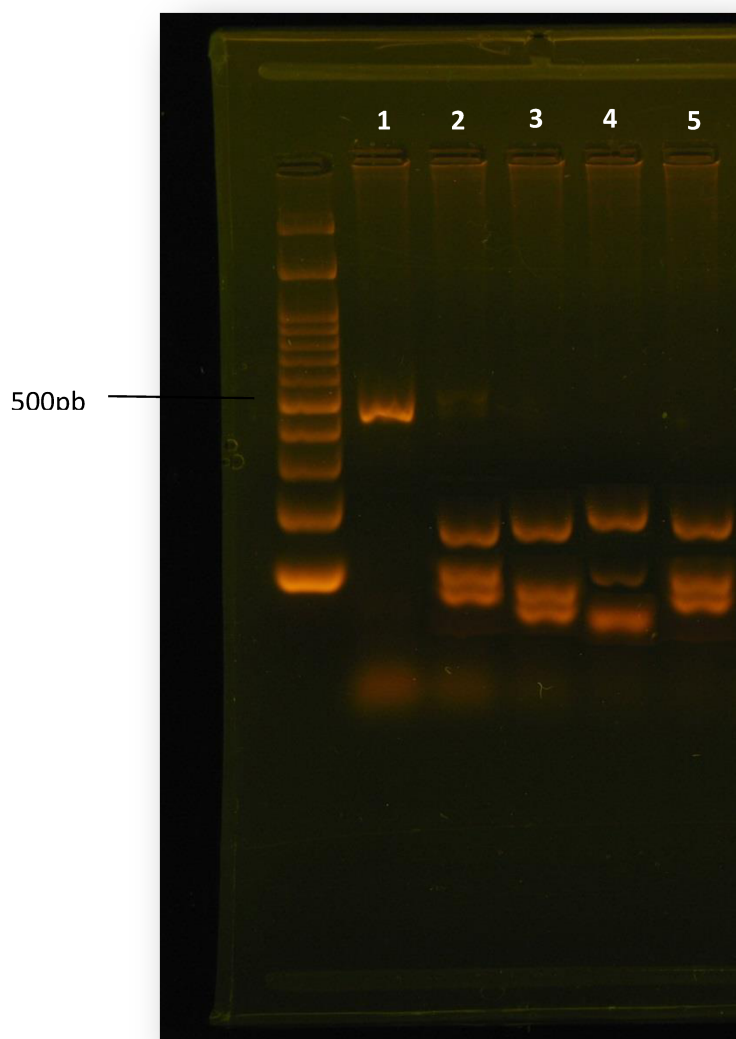


Figura 15 - Padrões de restrição gerados pela reação de PCR-RFLP com enzima MseI visualizados em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Linha 1 – Fragmento de gene cox1 integral; Linha 2 – *T. canis*; Linha 3 – *T. cati*, Linha 4 - *T. malaysiensis*; Linha 5 – *T. leonina*. Marcador de peso molecular – 100pb

2.4 Variabilidade genotípica intra e interespecífica associadas à distribuição geográfica

Pela metodologia de Pairwise (p-distance) calculou-se a taxa de variabilidade entre as sequências parciais do gene Cox1 de isolados: 1- da mesma espécie e da mesma região geográfica; 2- entre a mesma espécie de diferentes regiões geográficas; 3- entre *T. canis* e *T. cati* da mesma procedência.

A variabilidade intragenotípica dos *T. cati* oriundos da Dinamarca, variou entre 0 e 0,03 da Alemanha entre 0,03 e 0,125 da Rússia entre 0 e 0,02. No Japão a análise foi

realizada somente com duas amostras indicando taxa de 0,01. No Brasil não houve amostra de *T. cati* e na China como só houve uma, não foi possível fazer o cálculo.

A taxa de variabilidade observada nos *T. canis* foi de 0 a 0,03 naqueles procedentes Brasil, 0 a 0,02 nos da Dinamarca, 0 a 0,026 nos da Rússia e de 0,036 a 0,05 nos da China. Como no Japão só foram analisadas duas sequências a variação entre elas foi de 0,04%. Na Alemanha, todas as sequências foram idênticas não havendo, portanto, variação.

Não houve variação entre as três amostras de *T. leonina* procedentes de Portugal e nem entre as três de *T. malaysiensis* procedentes da Malásia.

Nos países estudados a variabilidade de *T. cati* foi entre 0 a 0,1, com a menor taxa para os helmintos da Alemanha e Japão e a maior da Rússia e Alemanha. A de *T. canis* foi entre 0 e 0,06, sendo a menor variação entre Brasil e Dinamarca e a maior entre Brasil e Japão.

Entre as espécies observou-se que a variabilidade ascendeu entre 0,1 e 0,2 para *T. canis* e *T. cati*, 0,07 e 0,1 para *T. canis* e *T. leonina*, 0,1 e 0,12 para *T. canis* e *T. malaysiensis*, 0,09 e 0,2 para *T. cati* e *T. leonina*, 0,1 para *T. cati* e *T. malaysiensis* e 0,1 para *T. leonina* e *T. malaysiensis*.

Isolados identificados pelo sequenciamento como *T. canis* e *T. cati* foram encontrados, juntos, em cinco dos oito países incluídos nesse estudo, fato não observado para outras espécies, visto que *T. malaysiensis* foi restrita à Malásia e *T. leonina* a Portugal. Portanto calculou-se variabilidade intergenotípica destas duas espécies resultando em variações de 0,1 na Dinamarca, 0,2 na Alemanha, 0,11 a 0,13 na China, 0,11 a 0,13 no Japão e de 0,1 na Rússia.

2.5 Comparação entre a técnica morfológica e as moleculares na determinação da espécie parasito

Na comparação entre as amostras identificadas pela microscopia e as sequenciadas, observou-se que sete (9,7%) apresentaram incongruência de resultados.

Dentre essas amostras CDK2_1 e CBRU38_1 provenientes de gatos e identificadas, morfológicamente, como *T. cati* foram consideradas *T. canis* pelo sequenciamento.

As amostras DDE2_2, DDE2_3, DDE2_4 1 oriundas de cães e identificadas de acordo com a morfologia como *T. leonina*, foram identificadas como *T. canis*.

DRU2_1 procedente de cão e CML1_1 de gato da Malásia, foram identificadas, morfologicamente, como *T. canis* e *T. malaysiensis*, respectivamente, entretanto o sequenciamento as caracterizou como *T. cati*.

Em relação ao PCR-RFLP, como não foi possível diferenciar os padrões de restrição de *T. canis* e *T. leonina*, as diferenças em relação a técnica morfológica foram observadas em apenas quatro (0,9%) das 424 amostras. As amostras CDK2_1 e CBRU38_1, identificadas morfologicamente como *T. cati* foram consideradas *T. canis/T. leonina* e DRU2_1 e CML1_1 identificadas pela morfologia como *T. canis* e *T. malaysiensis* respectivamente, foram caracterizadas como *T. cati* pelo PCR-RFLP (Figura 13).

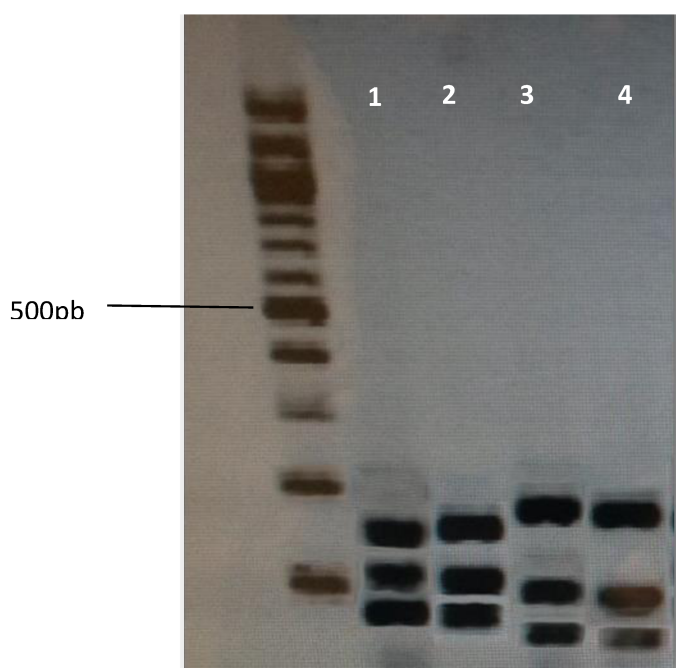


Figura 16 - Padrões de restrição gerados pela reação de PCR-RFLP com enzima MseI visualizados em gel de agarose 2% corado com GelRed®. Linha 1 – CDK2_1 (padrão de *T. canis/T. leonina*); Linha 2 – CBRU38_1 (padrão de *T. canis/T. leonina*); Linha 3 – DRU2_1 (padrão de *T. cati*); Linha 4 – CML1_1 (padrão de *T. cati*). Marcador de peso molecular – 100pb

Discussão

6 Discussão

Felídeos e Canídeos podem abrigar diversos parasitos, responsáveis por quadros patogênicos significantes, os quais pode-se incluir ascaridídeos dos gêneros *Toxocara* e *Toxascaris*. Além disso, essas espécies adquirem importância na saúde pública por serem consideradas zoonóticas. Entretanto, são parasitos negligenciados, não havendo amplos levantamentos de prevalência em animais e humanos. Da mesma forma análises genéticas dessas espécies são escassas, e no Brasil não existem trabalhos publicados que abordem essas questões.

A forma convencional de identificação desses nematódeos, é a microscopia, e embora seja considerada padrão ouro, apresenta limitações que podem levar a falsos diagnósticos. Em *Toxocara canis* e *Toxocara cati* o formato das aletas é de fácil visualização e usada de forma efetiva para diferenciação entre as espécies. Entretanto, o mesmo não ocorre em relação ao *Toxocara malaysiensis* devido a morfologia muito semelhante a do *T. canis*, tornando quase impossível a diferenciação. Em relação à *Toxascaris leonina* a diferença relevante entre essa espécie e o gênero *Toxocara* é a ausência do bulbo na parte final do esôfago, o qual requer técnica e experiência para correta visualização e identificação.

A identificação detalhada destas espécies é necessária para estudos de sistemática, ciclo de vida, epidemiologia e diagnóstico. Porém, Zhu et al. (2001) mencionaram que a diferenciação de nematódeos proximamente relacionados baseada, unicamente, na estrutura corporal é difícil e em algumas vezes até impossível.

A espécie, animal, na qual o parasito se encontra, também, é usada como referência na identificação. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Toxocara malaysiensis* são considerados parasitos exclusivos de canídeos e felídeos, respectivamente, enquanto *Toxascaris leonina* tem a capacidade de parasitar ambos os grupos. Embora existam relatos das diversas formas evolutivas de *T. canis* e *T. cati* em hospedeiros não tradicionais, não existem questionamentos sobre essas questões, necessitando de mais estudos que aprofundem esses achados.

Nesse estudo a identificação morfológica de todos os espécimes corroborou com a ideia da especificidade de hospedeiro, a qual é amplamente difundida na literatura, pois todos os espécimes provenientes de gato foram identificados como *T. cati* ou *T. malaysiensis* e os de cães como *T. canis* ou *T. leonina*.

Nematódeos tendem a ser bastante conservados em relação à morfologia, o que reduziria o poder discriminatório das técnicas morfológicas (Anderson et al., 1998). O advento das técnicas moleculares, fez com que essas questões pudessem ser elucidadas de forma mais efetivas, levando a resultados mais fidedignos.

Entre as técnicas, PCR é uma das mais utilizadas, devido à alta aplicabilidade, principalmente, pela capacidade em amplificar genes ou fragmentos de genes a partir de pequenas quantidades de material (Gasser, 1999).

A falha (3,6%) registrada por essa técnica, no presente estudo, pode ser, explicada pela forma de extração do DNA, pela escolha do gene alvo e/ou pelo *primer* escolhido para as reações de amplificação (Thompson, 2008).

Ácidos nucleicos intactos com alto grau de pureza são essenciais para a realização dessa técnica. Obter DNA molde puro e em quantidade suficiente a partir de alguns parasitos e/ou estádios evolutivos, pode ser tarefa difícil. Essa dificuldade pode ser exemplificada pela cutícula dos helmintos, que devido à sua robustez não se rompe com facilidade (Dawkins e Spencer, 1989).

Os kits para extração do DNA genômico total são utilizados, na maioria dos estudos, entretanto são relativamente caros e podem não estar disponíveis em alguns países. Dessa forma, é importante elaborar e aperfeiçoar protocolos que tenham como objetivo reduzir os custos mantendo a proporção e qualidade da extração dos ácidos nucleicos. Existem estudos comparativos de diferentes métodos de extração de DNA para fungos (Noor Adila et al., 2007; Fredericks et al., 2005), bactérias (Dauphin et al., 2010; Mygind et al., 2003), vírus (Dokanehiifard e Bidmeshkipour, 2010) e alguns parasitos (Babaei et al., 2011; Adamska et al., 2010; Sharbatkhori et al., 2009), entretanto nenhum desses estudos abordou a eficiência de diferentes métodos na extração de DNA de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp.

Mikaeilli et al (2013) identificaram essa lacuna e testaram seis diferentes protocolos para extração de DNA de parasitos destes gêneros. Os autores concluíram que o congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido é, altamente, eficiente no rompimento da cutícula do parasito otimizando a extração do DNA. A desvantagem é o alto custo quando comparado à métodos que utilizam somente rompimento mecânico da cutícula. Porém, é consideravelmente mais barato do que kits comerciais com resultados, igualmente, bons.

Baseado na publicação de Mikaeilli et al. (2013) o método escolhido para extração do mtDNA, nesse trabalho, foi o congelamento e descongelamento em

nitrogênio líquido, associado com ciclos de sonicação manual e posterior, digestão da cutícula remanescente com proteinase K. A otimização do protocolo permitiu que quantidade suficiente de DNA fosse extraído com sucesso.

Para esse trabalho o mtDNA foi eleito para as reações moleculares, pois devido a sua rápida evolução através de mutações (Gasser et al., 2013) apresenta sequência mais variável entre as espécies do que o rDNA (Gasser et al., 2006).

Em relação à escolha do gene alvo, *cox1* é integrante do mtDNA dos parasitos. Apesar de não ser o gene mais conservado dentro desse DNA (Li et al., 2008), apresenta alta taxa de substituição de nucleotídeos. Isso faz com que esse gene, seja capaz de fornecer informações mais detalhadas sobre os menores níveis taxonômicos do parasito. No entanto, essa mesma variabilidade pode levar a excessivos desequilíbrios na região de ligação, resultando em baixa sensibilidade da PCR (Cacciò e Ryan, 2008).

A escolha do *primer* é o passo chave no desenvolvimento de ensaios de PCR para a identificação de parasitos (Li et al., 2007). No presente estudo os *primers* TOXCOIF3 e TOXCOIR2 foram desenhados a partir de sequências do genoma mitocondrial, das espécies aqui estudadas, depositadas no Genbank. Hung et al. (1999) mostraram que uma ou duas bases nitrogenadas podem ser deliberadamente alteradas na porção 3'do *primer* senso ou na porção 5'do *primer* anti-senso para ampliar a especificidade dos mesmos. Nesse estudo a intenção era somente amplificar o fragmento do gene, para posterior realização de outras técnicas, tais como sequenciamento e PCR-RFLP. Dessa forma, os *primers* foram desenhados sem qualquer “mismatch” nas extremidades, garantindo total anelamento com as quatro espécies analisadas, minimizando o risco de falhas nas reações.

Foram obtidas e analisadas, nesse trabalho, 72 sequências das quatro espécies de ascarídeos procedentes de diferentes regiões geográficas do mundo. Os resultados mostraram que a maioria dos isolados foi identificado como sendo de parasitos hospedeiros-específicos, à exceção de *T. leonina*, confirmando o que se preconiza para esses helmintos. Três amostras fugiram desse padrão e apresentaram sequências relativas a outras espécies do gênero *Toxocara*, que teoricamente não deveriam parasitar aquela espécie de hospedeiro. Bhowmick (1964), Roth e Schnider (1971), Farion et al. (2011), Parsons et al. (1987), Baker et al (1989), Lee et al. (1993), Scholz et al. (2003) e Mundim et al. (2004) relataram resultados semelhantes a esse, ou seja, o encontro de *T. canis* em gatos e *T. cati* em cães, respectivamente, porém nenhum dos autores conjecturou hipóteses que justificassem esses achados.

Sequenciamento de ácidos nucleicos tem o potencial de resolver questões filogenéticas desde eventos recentes de especiação até divergência entre linhagens anciãs. A habilidade de elucidar as relações evolutivas em um nível particular é dependente do encontro de genes com determinada taxa de mudança. Em adição, conjuntos de dados de ácidos nucleicos contém grande número de caracteres que podem fornecer informações adicionais (Nadler, 1990).

A precisa visualização da variação de nucleotídeos necessita de sequenciamento, mas a PCR-RFLP é capaz de realizar a identificação de organismos nos menores níveis taxonômicos (Nadler et al., 1990). Esse, ensaio indireto usando endonucleases de restrição, surge como alternativa ao sequenciamento devido à fácil execução, reprodutibilidade e baixo custo operacional, fatores que tornam essa técnica atrativa.

Na literatura existe apenas o estudo de Jacobs et al. (1997) em relação à padronização de PCR-RFLP para *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. o qual é baseado no gene ITS2 do DNA ribossomal. Essa reação, feita em duas etapas, é capaz de diferenciar entre *T. canis*, *T. cati* e *T. leonina*. A presente pesquisa teve como objetivo padronizar reação de restrição para o gene *cox1* capaz de diferenciar as quatro espécies estudadas. De acordo com os padrões de restrição gerados foi possível diferenciar entre *T. canis*/*T. leonina*, *T. cati* e *T. malaysiensis*.

T. canis e *T. leonina* geraram o mesmo padrão de restrição não podendo ser diferenciadas entre si. *MseI* foi eleita, entre outros motivos, pois enzimas que reconhecem sequências de quatro bases, são normalmente mais utilizadas, em estudos de população, devido ao fato de terem mais sítios de reconhecimento ao longo da sequência, fornecendo, assim, melhores resultados (Nadler et al., 1990). Essa escolha foi feita a partir da criação de mapas de restrição, os quais foram baseados primeiramente em sequências disponíveis no Genbank e validados, posteriormente, com as sequências geradas nesse estudo. O mapa de restrição criado para *T. leonina* indicava a ausência de sítios de restrição compatíveis com a enzima, portanto o DNA não seria digerido, sendo essa espécie facilmente distinguível das outras, pelo PCR-RFLP. Como os parasitos dessa espécie foram os últimos a serem integrados ao projeto não houve validação, pois a técnica já estava padronizada.

Embora a técnica não tenha sido totalmente eficiente na diferenciação das espécies, os resultados obtidos enfatizam a especificidade de hospedeiro de *T. cati* e *T. malaysiensis* haja vista que exceto por quatro helmintos a maioria teve associação específica com o hospedeiro de origem.

A técnica desenvolvida, nesse estudo, apresenta considerável potencial, entretanto ressalta-se que a mesma necessita, ainda, de alguns ajustes de otimização.

O dogma ecológico convencional sugere que uma espécie deve ocupar determinado nicho ecológico (Anderson et al., 1998). *T. cati* parasitando cães e/ou *T. canis* parasitando gatos parece ir na direção contrária a isso. Algumas hipóteses foram estabelecidas para tentar explicar tais divergências, como as encontradas pelo sequenciamento e pela PCR-RFLP nesse trabalho. Uma delas estaria baseada no fato de ser resultado da mistura de espécies que se desenvolveram em alopatria e representam uma situação transitória na qual uma espécie está tentando substituir a outra. Outra hipótese seria a coexistência de espécies em um mesmo nicho como situação estável. Em complemento a isso, tais espécies estariam evoluindo no intuito de se estabelecerem em novos nichos ou em novos hospedeiros, garantindo assim a manutenção da espécie (Anderson et al., 1998).

A especificidade de hospedeiro é preconizada para diversos tipos de patógenos, não sendo exclusiva dos helmintos. Entretanto, acredita-se que essa característica possa ser superestimada devido a alguns fatores como: baixa amostragem de hospedeiros analisadas nas pesquisas; remoção de parasitos pelo próprio hospedeiro, seja ela mecânica ou imunológica; facilidade em se analisar hospedeiros amplamente difundidos; efeitos ambientais no sucesso das transmissão desses parasitos; e as práticas taxonômicas (Costello, 2016).

No contexto evolutivo um organismo só pode ser altamente específico se o hospedeiro tiver ampla distribuição, for abundante ou pelo menos facilmente infectado, caso contrário ele corre o risco de ser extinto (Poulin, 2014). Dessa forma, potenciais hospedeiros que são geograficamente raros, em pequeno número e que se localizam em áreas pobres em fauna não são candidatos à especificidade do parasito (Costello, 2015).

Cães e gatos estão presentes em todo o mundo, pois são animais extremamente próximos ao homem. Portanto, de acordo com os preceitos da teoria evolutiva, isso favoreceria a manutenção da especificidade de hospedeiro de *T. canis*, *T. cati* e *T. malaysiensis*. Independente da abundância de hospedeiros, as estratégias evolutivas mais importantes para os patógenos é ter eficientes mecanismos de dispersão (transmissão) e habilidade de reprodução nos diversos hospedeiros. Isso permitiria ao parasito, por exemplo, sobreviver mesmo com a escassez de hospedeiros bem como estender o alcance geográfico, passando a infectar indivíduos em outras áreas geográficas (Costello, 2016).

Ao longo da evolução de uma espécie as mudanças genéticas, quase invariavelmente, antecedem as alterações fenotípicas (Nadler et al., 1995), o que explicaria os helmintos, desse trabalho, apresentarem características morfológicas de uma espécie com genótipo de outra. Em corroboração a isso, Anderson et al. (1998) relataram que muitas espécies de nematódeos apresentam altos níveis de diferenciação genética, indicando que a evolução morfológica, deve progredir bem lentamente nesse filo.

Esses achados reforçam a idéia de que esses parasitos poderiam estar se modificando para aumentar a reprodutibilidade e consequentemente garantir a perpetuação da espécie.

A existência de variabilidade gênica e relações filogenéticas de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. baseados nos DNAs ribossomal e mitocondrial foram reportadas em diferentes estudos (Jacobs et al., 1997; Zhu e Gasser, 1998; Zhu et al., 1998; Gasser et al., 2006; Li et al., 2008; Fogt-Wyrwas et al., 2013; Mikaeili et al., 2015; Le et al., 2016). Entretanto, os ensaios baseados em genes ribossomais parecem ser mais populares e, pouca atenção é dispensada aos mitocondriais.

Dentre os genes ribossomais a regiões ITS são as principais escolhas por serem alguns dos *loci* gênicos mais variáveis e devido à existência de *primers* universais consolidados. No entanto, na análise das taxas de variabilidade intragenotípica, fornecidas por esses genes, entre indivíduos da mesma espécie percebe-se que são, praticamente, iguais àquelas que ocorrem, internamente, nesses indivíduos, com porcentagens inferiores a 1% (Stevenson et al., 1996; Heise et al., 1999; Dallas et al., 2000). Em contrapartida os genes mitocondriais, especialmente *cox1* e *nad4* apresentam diferenças entre 10 e 20% nas sequências de organismos de espécies diferentes, e de até 2% naqueles pertencentes à mesma espécie.

Diferentes marcadores genéticos fornecem diferentes padrões de estrutura genética dentro das populações de parasitos. Por ser haplóide o tamanho do mtDNA é menor do que os loci nucleares diploides, na mesma população o que faz com que haja maior variação intrapopulacional (Birky et al., 1989).

Nesse estudo foi observada grande variabilidade genotípica, havendo indivíduos da mesma espécie que apresentaram sequências idênticas entre si, assim como indivíduos apresentando variações gênicas de até 6,6%. Essa mesma taxa foi relatada por Blouin et al. (1998) e Anderson et al. (1998) em análises de nematódeos de bovinos pertencentes à espécie *Ostertagia ostertagi* e em *Ascaris suum*, respectivamente.

Entretanto, para *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. a maior variação gênica, em sequências do gene *cox1*, de indivíduos da mesma espécie, relatada foi de 3.7% (Mikaeilli et al., 2015).

Os índices de variabilidade observados entre sequências da mesma espécie (2 a 5%) e de espécies diferentes (10 a 20%) no presente trabalho, corroboraram com os dados relatados por Mikaeilli et al. (2015) e Li et al. (2008).

Na comparação entre *T. cati* e *T. leonina*, a variação nucleotídica observada (10-20%) foi a esperada, visto que são duas espécies pertencentes a gêneros distintos. No entanto, essa mesma taxa foi observada entre *T. canis* e *T. cati*, indicando que dentre as três espécies do gênero *Toxocara*, analisadas, nesse estudo, essas são as mais geneticamente divergentes. Essa distância talvez seja uma das explicações para as diferenças encontradas na biologia desses dois helmintos, tais como a preferência por determinado hospedeiro e a principal forma de infecção (transplacentária para *T. canis* e transmamária para *T. cati*).

A partir desses resultados, conjectura-se que *T. canis* e *T. cati* estão especiando-se a ponto de, daqui há algum tempo, serem completamente diferentes induzindo, inclusive, nova classificação taxonômica.

A análise dos loci ITS-1, 5.8S e ITS-2 do DNA ribossomal, embora mais conservados e por isso com menos taxa de substituição de nucleotídeos do que os mtDNA, também indicou considerável variabilidade entre *T. canis* e *T. cati* (9,4-11,3 para o ITS-1, 1,9 para o 5.8S e 26,1 para o ITS-2) (Zhu et al., 1998) reiterando os dados encontrados nesse estudo.

Os resultados dessa pesquisa reforçam a capacidade dos genes mitocondriais em diferenciar espécies efetivamente. Além disso, a variação na estrutura do genoma mitocondrial entre algumas espécies de nematódeos, estudados até hoje, indicam que os genes mitocondriais nesse grupo sofrem rearranjos gênicos relativamente frequentes, o que facilita o estudo de evolução do genoma mitocondrial. A elucidação desses mecanismos tem implicações na investigação das relações evolucionárias dos nematódeos (Hu e Gasser, 2006).

Análises em relação à filogenia e variações intragenotípicas, associadas à distribuição geográfica, também, foram realizadas. *T. canis* e *T. cati* foram provenientes de vários países, o que é pré-requisito para esse tipo de análise. O mesmo não ocorreu para *T. malaysiensis* e *T. leonina* que foram restritas à Malásia e Portugal, impossibilitando estudos filogeográficos.

Como ilustrado na árvore filogenética, construída nesse estudo, é possível observar que enquanto alguns isolados agruparam-se em um mesmo ramo, outros posicionaram-se em ramos diferentes e, às vezes, distantes.

A relação íntima observada pelo agrupamento de isolados de diferentes países em um mesmo ramo do filograma, sugere a existência atual ou recém interrompida de grande fluxo gênico entre as populações. Fluxo esse que é facilitado pela soma de três fatores: distribuição mundial da espécie hospedeira, o manejo humano e o tráfego entre as regiões geográficas dos hospedeiros. Em contrapartida, as barreiras de dispersão, o habitat, a estrutura social e o comportamento do hospedeiro podem influenciar negativamente no fluxo gênico (Nadler et al., 1990). Esses fatores fazem com que indivíduos da mesma espécie porém, geograficamente independentes se distanciem a ponto de apresentarem sequências gênicas, consideravelmente, divergentes.

A existência da variação geográfica não é surpreendente e foi confirmada para *Parascaris equorum* (Bellini et al., 1986) *Ascaris suum* (Betson et al., 2014; Betson et al., 2012; Criscione et al., 2007; Nejsun et al., 2005; Bellini et al., 1986) e *Echinococcus granulosus* (Limbery e Thompson, 1988). Alguns estudos sugerem que a diferenciação genética dos helmintos, aumenta em resposta ao aumento da distância geográfica entre populações (Flockhart et al., 1986; Limbery e Thompson, 1988).

Entretanto, pouco é conhecido sobre o quanto a distribuição geográfica influencia na variabilidade intragenotípica de *Toxocara* spp e *Toxascaris* sp, pois os trabalhos são restritos e os poucos que abordam essa questão envolvem um número limitado de isolados.

Nesse sentido, Fogt-Wyrwas et al. (2013) analisaram sequências do gene ITS-2 de *T. cati* e *T. leonina* ourindas da Polônia e da Austrália e observaram variações intragenotípicas de acordo com o local de origem do helminto. No entanto, para *T. canis* houve homologia entre as sequencias gênicas de alguns espécimes independente da procedência geográfica. Zhu et al. (2001) em análise dos genes ITS-1, 5.8S e ITS-2 também relataram ocorrência de variação nucleotídica entre sequências de *T. canis* e *T. cati*, provenientes da Malásia e do Reino Unido e da Malásia e da Austrália, respectivamente. Os autores observaram que as maiores variações ocorreram entre isolados de *T. cati*, concordando com os resultados desse estudo. Não há embasamento na literatura para se explicar tal achado.

A diversidade de sequências intrapopulacionais no mtDNA varia consideravelmente em nematódeos. Alguns não apresentam variação e outros possuem

números até 10 vezes maiores do que os comumente observados em vertebrados, como é o caso de *Ascaris* spp. e de trichostrongilídeos (Blouin et al., 1992; Blouin et al., 1995; Anderson e Jaenike, 1997).

Essa diferença de padrão pode ser explicada pela mistura de populações de localidades diferentes, resultante do movimento global de pessoas e animais domésticos. Da mesma forma, o tamanho total da população também pode influenciar, sendo a taxa de variação diretamente proporcional ao tamanho efetivo da população. Além disso, a rápida evolução do mtDNA parece ser responsável pelos níveis de variação alélica.

O mtDNA evolui em diferentes velocidades nos diferentes grupos de organismos (Rand et al., 1994), entretanto nos nematódeos, esse parece evoluir de forma mais rápida. Martin e Polumbi (1993) mostraram que o mtDNA evolui mais rápido em endotérmicos do que em ectotérmicos. Os autores sugeriram que a alta taxa metabólica dos endotérmicos, resulta em excesso de produção de radicais livres que causam danos oxidativos nesse DNA.

Embora essa teoria não seja comprovada, Hugall et al. (1995) e Hugall et al. (1997) relataram maior variabilidade em *Ascaris* spp. do que em nematódeos que parasitam plantas e insetos. Como os helmintos desse estudo, parasitam mamíferos, os quais são animais endotérmicos, acredita-se que eles passem por processo semelhante, o que justificaria tal variabilidade.

Os níveis de variação no gene *cox1*, observados no presente trabalho, para a mesma espécie, porém de diferentes regiões geográficas excede o padrão de variação intraespecífica comum, o que pode sugerir que um processo de especiação esteja em andamento. Baseado em estudos filogenéticos com diversos organismos, infere-se que as espécies estudadas nesse trabalho, tinham um ancestral comum, e que devido à processos como mutações, isolamento simpátrico e isolamento reprodutivo, esse ancestral diferenciou-se em uma dessas espécies. Embora essas espécies estejam agora em íntimo contato, devido à ampla distribuição mundial e o fluxo gênico esteja reestabelecido, o processo evolutivo continua, fazendo com que elas se distanciem cada vez mais, especializando-se em hospedeiros e formas de infecção, bem como, diferenciando-se fenotípica e genotipicamente.

Para garantir a fidelidade dos resultados, bem como avaliar o potencial na identificação de espécies, foram empregadas três técnicas de identificação, sendo uma morfológica e duas moleculares.

A comparação entre as técnicas revelou divergências de resultados de 9.7.1% entre sequenciamento e microscopia e 0,9% entre PCR-RFLP e microscopia. Como os padrões de restrição de *T. canis* e *T. leonina*, no PCR-RFLP, foram muito semelhantes, não houve comparação entre as técnicas moleculares. Entretanto ressalta-se que para *T. cati* e *T. malaysiensis* o sequenciamento e o PCR-RFLP apresentaram 100% de concordâncias nos resultados.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que mais estudos devem ser realizados utilizando-se outros genes, de diferentes regiões do DNA, para comparação e obtenção de dados mais fidedignos. De acordo com Yang et al. (2009), quando o resultado é fornecido por somente um locus gênico, os dados não são conclusivos.

Dados moleculares têm vários atributos que são atrativos, particularmente em casos de análises evolucionárias nas quais as características morfológicas disponíveis são insuficientes. Entretanto, estudos moleculares e morfológicos podem e devem ser complementares (Hillis et al., 1987) e quando combinados podem ajuda a elucidar questões que não poderiam ser resolvidas utilizando-se apenas um dos ensaios (Nadler, 1990).

Esse estudo forneceu bases sobre a estrutura do genoma, a genética de populações, taxonomia e evolução de parasitos com importância socioeconômica. O conjunto de dados sobre nucleotídeos e sequências de aminoácidos, derivados do sequenciamento do genoma mitocondrial, pode ser empregado para estudos amplos da filogenia desses parasitos. Ferramentas moleculares disponíveis e os avanços obtidos até o momento, fornecem prospectos e oportunidades para estudos futuros em diversas áreas, tais como processos de rearranjos gênicos, herança de genes mitocondriais e sistemática, ecologia e epidemiologia de nematódeos.

Conclusões

7 Conclusões

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, concluiu-se que:

- Pela microscopia estereoscópica, todos os helmintos provenientes de canídeos foram identificados como *T. canis* ou *T. leonina*, e os de felídeos como *T. cati* ou *malaysiensis*.
- Pelo sequenciamento, com exceção de três amostras, todas as restantes, apresentaram especificidade de hospedeiro.
- O PCR-RFLP não foi capaz de diferenciar entre *T. canis* e *T. leonina*.
- Pelo padrão de restrição gerado duas amostras de gato foram consideradas *T. canis/T. leonina* e uma de cão *T. cati*.
- Variação genotípica e homologia foram observadas entre isolados da mesma espécie.
- A maior taxa de variabilidade (distância filogenética) encontrada foi de 10%.
- A distância filogenética entre *T. canis* e *T. cati* foi similar às encontradas entre *T. cati* e *T. leonina*.
- A procedência geográfica tem relação com a genética dos helmintos.
- Foram observadas sequências homólogas em isolados de diferentes países, indicando a ocorrência de fluxo gênico.
- A especificidade de hospedeiro preconizada para *T. canis*, *T. cati*. e *T. malaysiensis* foi confirmada com exceção de três helmintos.
- Houve divergência de resultados entre microscopia e sequenciamento e entre microscopia e PCR-RFLP.
- As técnicas moleculares apresentaram concordância nos resultados de *T. cati* e *T. malaysiensis*.

Bibliografia

8 Bibliografia

ADAMSKA, M., LEOŃSKA-DUNIEC, A., MACIEJEWSKA, A., SAWCZUK, M., SKOTARCZAK, B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. **Parasite**, v. 17, p.299-305, 2010.

AKAO, N., TOMODA, M., HAYASHI, E., SUZUKI, R., SHIMIZU-SUGANUMA, M., SHICHINOHE, K., FUJITA, K. Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. **Veterinary Parasitology**, v.113, p.229-237, 2003.

ANARUMA FILHO, F., CHIEFFI, P.P., CORREA, C.R., CAMARGO, E.D., SILVEIRA, E.P., ARANHA, J.J., RIBEIRO, M.C. Human toxocariasis: a seroepidemiological survey in the municipality of Campinas (SP), Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p.303-307, 2002.

ANDERSON, T.J., JAENIKE, J. Host specificity, evolutionary relationships and macrogeographic differentiation among *Ascaris* populations from humans and pigs. **Parasitology**, v. 115, p.325-342, 1997.

ANDERSON, T.J., BLOUIN, M.S., BEECH, R.N. Population biology of parasitic nematodes: application of genetic markers. **Advances in Parasitology**, v. 41, p.219-283, 1998.

ARIAS, M.C., OLIVEIRA FRANCISCO, F., SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. **Apoidea Neotropica**, 2003.

AZAM, D., UKPAI, O.M., SAID, A., ABD-ALLAH, G.A., MORGAN, E.R. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, p.649-656, 2012.

BABAEI, Z., OORMAZDI, H., REZAEI, S., REZAEIAN, M., RAZMJOU, E. *Giardia intestinalis*: DNA extraction approaches to improve PCR results. **Experimental Parasitology**, v. 128, p.159-162, 2011.

BAKER, M.K., LANGE, L., VERSTER, A., VAN DER PLAAT, S. A survey of helminths in domestic cats in the Pretoria area of Transvaal, Republic of South Africa. Part 1: The prevalence and comparison of burdens of helminths in adult and juvenile cats. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 60, p. 139–142, 1989.

BARBOSA, A.M., SEGOVIA, J.M., VARGAS, J.M., TORRES, J., REAL, R., MIQUEL, J. Predictors of Red Fox (*Vulpes vulpes*) helminth parasite diversity in the provinces of Spain. **Wildlife Biology in Practice**, v. 1, p. 3-14, 2005.

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

BARUTZKI, D., SCHAPER, R. Results of parasitological examinations of fecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. **Parasitology Research** v. 109, p. 45-60, 2011.

BELLINI, W.J., ENGLUND, G., RICHARDSON, C.D., ROZENBLATT, S., LAZZARINI, R.A. Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences and deduced amino acid sequences. **Journal of Virology**, v. 58, p.408-416, 1986.

BETSON, M., NEJSUM, P., LLEWELLYN-HUGHES, J., GRIFFIN, C., ATUHAIRE, A., ARINAITWE, M., ADRIKO, M., RUGGIANA, A., TURYAKIRA, G., KABATEREINE, N.B., STOTHARD, J.R. Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. v.106, p.75-83, 2012.

BETSON, M., PETER, N., BENDALL, R.P., DEB, R.M., STOTHARD, J.R. Molecular Epidemiology of Ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris*. **The Journal of Infection Disease**, v.210, p. 932-941, 2014.

BHOWMICK, D.K. Contributions to the problem of the migration route of Ascarid larvae (*Ascaris lumbricoides* linn'e 1758 and *Toxocara canis* werner 1782) in the experimental and natural host. **Z Parasitenkd**, v.24, p. 121-168, 1964.

BIRKY, C.W. J.R., FUERST, P., MARUYAMA, T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. **Genetics**, v.121, p.613-627, 1989.

BLOUIN, M.S., YOWELL, C.A., COURTNEY, C.H., DAME, J.B. Host movement and the genetic structure populations of parasitic nematodes. **Genetics**, v. 141, p. 1007-1014, 1995.

BLOUIN, M.S., YOWELL, C.A., COURTNEY, C.H., DAME, J.B. Substitution bias, rapid saturation, and the use of mtDNA, for nematode systematics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, p. 1719-1727, 1998.

BORECKA, A., GAWOR, J., NIEDWOROK, M., SORDYL, B. 2010. Occurrence of *Toxocara* spp. eggs in household environment of children with diagnosed toxocariasis in Łódzvoivodeship. **Wiad Parazytology**, 56, 141-144.

BOWMAN, D.D., LYNN, R.C., EBERHARD, M.L., ALCARAZ, A. **Georgis' Parasitology for Veterinarians**. 9th ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 2009.

CACCIÒ, S.M., RYAN, U. Molecular epidemiology of giardiasis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 2, p. 75-80, 2008.

CARDILLO, N., ROSA, A., RIBICICH, M., LÓPEZ, C., SOMMERFELT, I. Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB/c mice, migratory behaviour and pathological changes. **Zoonoses Public Health**, v.56, p.198-205, 2009.

CHEN, W.H., MINGUEZ, P., LERCHER, M.J., BORK, P. OGEE: an online gene essentiality database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. D901–D906, 2012.

CHIEFFI, P.P., MULLER, E.E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp. no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, estado do Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, v.10, p.367-372, 1976.

CHIEFFI, P.P., SANTOS, S.V., QUEIROZ, M.L, LESCANO, S.A. Human Toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p.301-308, 2009.

CHO, M.K., LEE, K.H., LEE, S.J., KANG, S.W., OCK, M.S., HONK, Y.C., LEE, Y.S., YU, H.S. Identification of host immune regulation candidate genes of *Toxascaris leonina* by expression sequenced tags (ESTs) analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 242-247, 2009.

COSTELLO, M.J. Parasite rates of discovery, global species richness and host specificity. **International Society for Computacional Biology**, v. 56, p. 588-599, 2016.

COSTELLO, M.J. Biodiversity: the known, unknown and rates of extinction. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 368-371, 2015.

CRIADO-FORNELIO, A., GUTIERREZ-GARCIA, L., RODRIGUEZ-CAABEIRO, F., REUS-GARCIA, E, ROLDAN-SORIANO, M.A., DIAZ-SANCHEZ, M.A. A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p.245-251, 2000.

CRISCIONE, C.D., ANDERSON, J.D., RABY, K., SUDIMACK, D., SUBEDI, J., RAI, D.R., UPADHAYAY, R.P., JHA, B., WILLIAMS-BLANGERO, S., ANDERSON, T.J. Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: development and assessment of utility. **Journal of Parasitology**, v. 93, p.704-708, 2007.

DAI, R.S., LI, Z.Y., LI, F., LIU, D.X., LIU, W., LIU, G.H., HE, S.W., TAN, M.W., LIN, R.Q., LIU, Y., ZHU, X.Q. Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.348-350, 2009.

DALLAS, J.F., IRVINE, R.J., HALVORSEN, O. DNA evidence that *Ostertagia gruehneri* and *Ostertagia arctica* (Nematoda: Ostertagiinae) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific. **International Journal For Parasitology**, v. 30, p.655-658, 2000.

DALIMI, A., SATTARI, A., MOTAMEDI, G. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p.129-133, 2006.

DAUPHIN, L.A., STEPHENS, K.W., EUFINGER, S.C., BOWEN, M.D. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Yersinia pestis* DNA from bacterial suspensions and spiked environmental samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p.163-1672, 2010.

DAWKINS, H.J., SPENCER, T.L. The isolation of nucleic acid from nematodes requires an understanding of the parasite and its cuticular structure. **Parasitology Today**, v.5, p.73-76, 1989

DE SAVIGNY, D, H., VOLLER, A., WOODRUFF, A.W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p.284-288, 1979.

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

DOKANEHIIFARD, S., BIDMESHKIPOUR, A. Comparison of three methods for hepatitis B virus DNA extraction of infected serum samples. **European Journal of Biological Sciences**, v.2, p.26-30, 2010.

DUBNÁ, S., LANGROVÁ, I., NÁPRAVNÍK, J., JANKOVSKÁ, I., VADLEJCH, J., PEKÁR, S., FECHTNER, J. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p.120-128, 2007.

ENGBAEK, K., MADSEN, H., LARSEN, SO. A survey of helminths in stray cats from Copenhagen with ecological aspects. **Z Parasitenkd**, v. 70, p.87-94, 1984.

FAHRION, A.S., SCHNYDER, M., WICHERT, B., DEPLAZES, P. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance? **Veterinary Parasitology**, v. 177, p.186-189, 2011.

FAGERHOLM, H.P. Systematic implications of male caudal morphology in ascaridoid nematodes parasites. **Systematic Parasitology**, v. 19, p. 215-218, 1991.

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

FAUST, E. C.; SAWITZ, W.; TOBIE, J.; ODOM, V.; PERES, C.; LINCICOME, D. R. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoan and helminthes in feces. **Journal of Parasitology**, Winston-Salem, v. 25, p. 241-262, 1938.

FIALHO, P.M.M., CORRÊA, 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, p.1193-1199, 2016.

FIGUEIREDO, S.D., TADDEI, J.A., MENEZES, J.J., NOVO, N.F., SILVA, E.Q., CRISTOVÃO, H.L., CURY, M.C. Clinical-epidemiological study of toxocariasis in a pediatric population. **Jornal de Pediatria**, v. 81, p.126-132, 2005.

FINSTERER, J. AUER, H. Neurotoxocarosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p.279-287, 2007.

FISCHER, M. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. **Trends in Parasitology**, 19, 167-170, 2003.

FLOCKHART, H.A., CIBULSKIS, R.E., KARAM, M., ALBIEZ, E.J. Onchocerca volvulus: enzyme polymorphism in relation to the differentiation of forest and savannah strains of this parasite. **Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p.285-292, 1986.

FOGT-WYRWAS, R., MIZGAJSKA-WIKTOR, H., PACOŃ, J., JAROSZ, W. Intraspecific variation between the ITS sequences of *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* from different host species in south-western Poland. **Journal of Helminthology**, v. 87, p.432-442, 2013.

FREDERICKS, S., MORETON, M., MACPHEE, I.A., MOHAMED, M., MARLOWE, S., JORGA, A., JOHNSTON, A., CARTER, N.D., HOLT, D.W. Genotyping cytochrome P450 3A5 using the Light Cycler. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 42, p.376-381, 2005.

FREITAS, M.G. **Helmintologia Veterinária**. 4. ed. Belo Horizonte: Gráfica Rabelo, 1980. 397 f.

GAMBOA, M.I. Effects of temperature and humidity on the development of **eggs** of *Toxocara canis* under laboratory conditions. **Journal of Hemintology**, v.79, p.327-331, 2005.

GASSER, R.B. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara*. **Veterinary Parasitology**, v. 193, n.4, p. 353-364, 2013.

GASSER, R.B. PCR-based technology in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 229-258, 1999.

GASSER, R.B., BOTT, N.J., CHILTON, N.B., HUNT, P.R., BEVERIDGE, I. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock – bionomic and biotechnological implications. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 325–334, 2008.

GASSER, R.B., HU, M., CHILTON, N.B., CAMPBELL, B.E., JEX, A.R., OTRANTO, D., CAFARCHIA, C., BEVERIDGE, I., ZHU, X.Q. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. **Nature Protocols**, v. 1, p. 3121–3128, 2006.

GATES, M.C., NOLAN, T.J. Risk factors for endoparasitism in dogs: retrospective case-control study of 6578 veterinary teaching hospital cases. **Journal of Small Animal Practice**, v.50, p.636-640, 2009.

GIBBONS, L.M., JACOBS, D.E., SANI, R.A. *Toxocara malaysiensis* n. sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from domestic cat (*Felis catus* L.). **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 660-665, 2001.

GLICKMAN, L.T., SCHANTZ, P.M., Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic reviews**, v. 3, p. 230-250, 1981.

GLICKMAN, L.T., SUMMERS, B.A. Experimental *Toxocara canis* infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p.2247-2254, 1983.

GREVE, J.H. Age resistance to *Toxocara canis* in ascarid-free dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.32, p.1185-1192, 1971.

GOEZE, J. A. E. Versuch einer Naturgeschichte der Eingeweidewurmer thierischer Körper, 1782.

GUNDLACH, J.L., SADZIKOWSKI, A.B., TOMCZUK, K. Contamination of selected urban and rural environments with *Toxocara* eggs. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 52, p.395-396, 1996.

HALL, T.A. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HAMILTON, C.M., STAFFORD, P., PINELLI, E., HOLLAND, C.V. A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. **Parasitology**, v.132, p.791-801, 2006.

HEISE, M., EPE, C., SCHNIEDER, T. Differences in the second internal transcribed spacer (ITS-2) of eight species of gastrointestinal nematodes of ruminants. **The Journal of Parasitology**, v. 85, p.431-435, 1999.

HOFER, S., GLOOR, S., MÜLLER, U., MATHIS, A., HEGGLIN, D., DEPLAZES, P. High prevalence of *Echinococcus multilocularis* in urban red fox (*Vulpes vulpes*) and voles (*Arvicolas terrestris*) in the city of Zürich, Switzerland. **Parasitology**, v. 120, p. 135-142, 2000,

HOLLAND, C.V., SMITH, H.V., Toxocariasis and the Skin. In: Holland, C.V., Smith, H.V., (Eds.), *Toxocara: The enigmatic parasite*. Oxfordshire, **CAB International**, p. 145-157, 2006.

HU, M., GASSER, R.B. Mitochondria genomes of parasitic nematodes – progress and perspectives. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 78-84, 2006.

HU, M., CHILTON, N.B., GASSER, R.B. The mitochondrial genomics of parasitic population genetics and systematics . **Advances in Parasitology**, v. 56, p. 133-212, 2004.

HU, M., CHILTON, N.B., GASSER, R.B. The mitochondrial genome of *Strongyloides stercoralis* (Nematoda) - idiosyncratic gene order and evolutionary implications. **International Journal of Parasitology**, v. 33, p.1393-1408, 2003.

HUNG, G.C., CHILTON, N.B., BEVERIDGE, I., GASSER, R.B. Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids: implications for phylogenetic inference. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 1949-1964, 1999.

HUGALL, A., MORITZ, C., STANTON, J., WOLSTENHOLME, D.R. Low, but strongly structured mitochondrial DNA diversity in root knot nematodes (Meloidogyne). **Genetics**, v.136, p.903-912, 1994.

HUGALL A, STANTON J, MORITZ C. Evolution of the AT-rich mitochondrial DNA of the root knot nematode, *Meloidogyne hapla*. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, p.40-48, 1997.

JACOBS, D.E., ZHU, X.Q., GASSER, R.B., CHILTON, N.B. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog, fox and cat. **Acta tropica**, v. 68, p. 191-200, 1997.

JAROSZ, W., MIZGAJSKA-WIKTOR, H., KIRWAN, P., KONARSKI, J., RYCHLICKI, W., WAWRZYNIAK, G. Developmental age, physical fitness and *Toxocara* seroprevalence amongst lower-secondary students living in rural areas contaminated with *Toxocara* eggs. **Parasitology**, v. 137, v.53-63, 2010.

KENNEDY, M.W., MAIZELS, R.M., MEGHJI, M., YOUNG, L., QURESHI, F., SMITH, H.V. Species-specific and common epitopes on the secreted and surface antigens of *Toxocara cati* and *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, v. 9, p.407-420, 1987.

KHALAFALLA, R. E., A survey study on gastrointestinal parasites of stray cats in northern region of Nile delta, Egypt. **PloS One**, v. 6, e20283, 2011.

KWON, N.H., OH, M.J., LEE, S.P., LEE, B.J., CHOI, D.C. The prevalence and diagnostic value of toxocariasis in unknown eosinophilia. **Annals of Hematology**, v.85, p.233-238, 2006.

LABARTHE, N., SERRÃO, M.L., FERREIRA, A.M., ALMEIDA, N.K., GUERRERO, J. A survey of gastrointestinal helminths in cats of the metropolitan region of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.123, p.133-139, 2004.

LABRUNA, M.B., PENA, H.F.J., SOUZA, S.L.P., PINTER, A., SILVA, J.C.R., RAGOZO, A.M.A., CAMARGO, L.M.A., GENNARI, S.M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do Município de Monte Negro, Rondônia. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v. 3, p. 183-193, 2006.

LASSINIG, H., PROSL, H., HINTERDORFER, F. Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes*) in Styria. **Wiener Tierärztliche Monatschrift**, v. 85, p.116-122, 1998.

LE, T.H., ANH, N.T.L., NGUYEN, K.T., NGUYEN, N.T.B., THUY, D.T.T., GASSER, R.B. *Toxocara malaysiensis* infections in domestic cats in Vietnam – An emerging zoonotic issue? **Infection, genetics and evolution**, v. 37, p.94-98, 2016.

LEE, C.C., CHENG, N.A.B.Y., BOHARY, Y. *Toxocara canis* from domestic cats in Kuala Lumpur. **Tropical Biomedicine**, v. 10, p. 79-80, 1993.

LEIPER, R.T. two new genera of nematodes occasionally parasitic in man. **British Medical Journal**, 1907.

LI, M.W., LIN, R.Q., CHEN, H.H., SANI, R.A., SONG, H.Q., ZHU, X.Q. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. **Molecular and Cellular Probes**, v. 21, p. 349-354, 2007.

LI, M.W., LIN, R.Q., SONG, H.Q., WU, X.Y., ZU, X.Q., The complete mitochondrial genomes for three *Toxocara* species of human and animal health significance. **BMC Genomics**, v. 9, p. 224, 2008.

LIAO, C.W., SUKATI, H., D'LAMINI, P., CHOU, C.M., LIU, Y.H., HUANG, Y.C., CHUNG, M.H., MTSETFWA, J.S., JONATO, J., CHIU, W.T., CHANG, P.W., DU, W.Y., CHAN, H.C., CHU, T.B., CHENG, H.C., SU, W.W., TU, C.C., CHENG, C.Y., FAN, C.K. Seroprevalence of *Toxocara canis* infection among children in Swaziland, southern Africa. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, p.73-80, 2010.

LIM, S.A., GOH, K.Y., TOW, S., FU, E., WONG, T.Y., SEAH, A., TAN, C., CULLEN, J.F. Optic neuritis in Singapore. **Singapore Medical Journal**, v.49, p. 667-671, 2008.

LIMBERY, A.J., THOMPSON, R.C. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. **International Journal of Parasitology**, v. 18, p.803-811, 1988.

LIU, G.H., ZHOU, D.H., ZHAO, L., XIONG, R.C., LIANG, J.Y., ZHU, X.Q. The complete mitochondrial genome of *Toxascaris leonina*: Comparison with other closely

related species and phylogenetic implications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p.329-333, 2014.

LINSTOW, O. F. B. V. Beobachtungen an neuen und bekannten Nemanthelminthen. **Archiv für Mikroskopische Anatomie**. v. 60, p.217-32, 1902.

LLOYD, S. *Toxocara canis*: the dog. In: Lewis, J.W., Maizels, R.M. (Eds.), *Toxocara and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives*, **Institute of Biology**, London, England, p. 11-24, 1993.

LLOYD, S., AMERSINGHE, P.H., SOULSBY, E.J.F. Periparturient immunosuppression in the bitch and its influence on infection with *Toxocara canis*. **Journal of Small Animal Practice**, v. 24, p. 237-247, 1983.

LUTY, T. Prevalence of species of *Toxocara* in dogs, cats and red foxes from the Poznan region, Poland. **Journal of Helminthology**, v. 75, p.153-156, 2001.

MACPHERSON, C.N., The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. **International Journal of Parasitology**, v. 43, p. 999-1008, 2014.

MAGNAVAL, J.F., FABRE, R., MAURIÈRES, P., CHARLET, J.P., DE, LARRARD. B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology Research**, v.77, p.697-702, 1991.

MAGNAVAL, J.F., GLICKMAN, L.T., DORCHIES, P., MORASSIN, B. Highlights of human toxocariasis. **Korean Journal of Parasitology**, v. 39, p. 1-11, 2001.

MARTIN, A.P., PALUMBI, S.R. Protein evolution in different cellular environments: cytochrome b in sharks and mammals. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p.873-891, 1993.

MATSUO, J. NAKASHIO, S Prevalence of fecal contamination in sandpits in public parks in Sapporo City, Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 128, p.115-119, 2005.

MATTIA, S., COLLI, C.M., ADAMI, C.M., GUILHERME, G.F., NISHI, L., RUBINSKY-ELEFANT, G., MARCHIORO, A.A., GOMES, M.L., FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Seroprevalence of *Toxocara* infection in children and environmental contamination of urban areas in Paraná State, Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 86, n.4, p. 440-445, 2012.

MIKAEILI, F., KIA, E.B., SHARBATKHORI, M., SHARIFDINI, M., JALALIZAND, N., HEIDARI, Z., ZAREI, Z., STENSVOLD, C.R., MIRHENDI, H. Comparison of six simple methods for extracting ribosomal and mitochondrial DNA from *Toxocara* and *Toxascaris* nematodes. **Experimental Parasitology**, v. 134, p.155-159, 2013.

MIKAEILI, F., MIRHENDI, H., MOHEBALI, M., HOSSEINI, M., SHARBATKHORI, M., ZAREI, Z., KIA, E.B. Sequence variation in mitochondrial cox1 and nad1 genes of ascaridoid nematodes in cats and dogs from Iran. **Journal of Helminthology**, v. 89, p. 496-501, 2015.

MIRCEAN, V., TITILINCU, A., VASILE, C., 2010. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. **Veterinary Parasitology** 171, 163-166.

MIZGAJSKA-WIKTOR, H., UGA, S. Exposure and environmental contamination. In: Holland, C.V, SMITH, H.V. (Eds), *Toxocara: The enigmatic parasite*. CABI Publishing, Oxfordshire, p. 211-227.

MUNDIM, T.C.D., OLIVEIRA JÚNIOR, S.D., RODRIGUES, D.C., CURY, M.C. 2004. Frequency of helminthes parasites in cats in Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.562-563, 2004.

MYGIND, T., ØSTERGAARD, L., BIRKELUND, S., LINDHOLT, J.S., CHRISTIANSEN, G. Evaluation of five DNA extraction methods for purification of DNA from atherosclerotic tissue and estimation of prevalence of *Chlamydia pneumoniae* in tissue from a Danish population undergoing vascular repair. **BMC Microbiology**, v. 3, p.19-31, 2003.

NADLER, S.A. Molecular approaches to studying helminth population genetics and phylogeny. **International Journal of Parasitology**, v. 20, p.11-29, 1990.

NEJSUM, P., FRYDENBERG, J., ROEPSTORFF, A., PARKER, E.D. JR. Population structure in *Ascaris suum* (Nematoda) among domestic swine in Denmark as measured by whole genome DNA fingerprinting. **Hereditas**, v. 142, p.7-14, 2005.

NIJSSE, R., PLOEGER, H.W., WAGENAAR, J.A., MUGHINI-GRAS, L. Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. **Parasitology Research**, v. 115, p.4519-4525

NOOR ADILA, A.K., FARAH DIBA, A.B., ZAMRI, Z., WAN MOHTAR, W.Y., AIDIL, A.H., MAHADI, N.M. AND MURAD, A.M.A. Comparison of methods for isolating high quality DNA and RNA from an oleaginous fungus *Cunninghamella bainieri* strain 2a1. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 3, p.7-13, 2007.

OLVEIRA-SEQUEIRA, T.C., AMARANTE, A.F., FERRARI, T.B., NUNES, L.C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 19-27, 2002.

ORYAN, A., SADJJADI, S.M., AZIZI, S. Longevity of *Toxocara cati* larvae and pathology in tissues of experimentally infected chickens. **Korean Journal of Parasitology**, v.48, p.79-80, 2010.

OSHIMA, Y. Heat-resistant mechanism of the cellular components of thermophilic bacteria. **Sakagaku**, v. 48, p.895 -901, 1976.

OVERGAAUW, P.A. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 23, p. 233-251, 1997.

OVERGAAUW, P.A., VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 398-403, 2013.

PARSONS, J.C. Ascarid infections of cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 17, p. 1307-1339, 1987.

PFEIFFER, F., KUSCHFELDT, S., STOYE, M. Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* LINNE 1758) in south Sachsen-Anhalt--1: Cestodes. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.104, p.445-448, 1994.

POULIN, R., Parasites biodiversity revisited: frontiers and constraints. **International Journal of Parasitology**, v.44, p. 581-589, 2014.

PRUNIER, F., DELÉPINE, S., VICTOR, J., DE GENTILE, L., MOREAU, C., LAPORTE, J., DUPUIS, J.M., GESLIN, P. Löffler's fibroblastic endocarditis. A report of a case complicating toxocarosis. **Archives des maladies du Coeur et des vaisseaux** v. 94, p.226-230, 2001.

QUEIROZ, M.L., SIMONSEN, M., PASCHOALOTTI, M.A., CHIEFFI, P.P. Frequency of soil contamination by *Toxocara canis* eggs in the south region of São Paulo municipality (SP, Brazil) in a 18 month period. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p.317-319, 2006.

RAILLIET, A., HENRY, A. Sur une filaire péritonéale des porcins, **Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique**, 1911.

RAND, D.M., DORFSMAN, M., KANN, L.M. Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 138, p.741-756, 1994.

REPERANT, L.A., HEGGLIN, D., TANNER, I., FISCHER, C., DEPLAZES, P. Rodents as shared indicators for zoonotic parasites of carnivores in urban environments. **Parasitology**, v. 136, p. 329–337, 2009.

RHODE, K. Helminthen aus Katzen und Hunden in Malaya: Bemerkungen zu ihrer epidemiologischen Bedeutung für den Menschen. **Zitschrift für Parasitenkunde**, v.22, p.237-244, 1962.

ROLDÁN, W.H., ESPINOZA, Y.A., HUAPAYA, P.E., JIMÉNEZ, S. Diagnosis of human toxocarosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, p.613-620, 2010.

ROTH, B., SCHNEIDER, C.C. Relation of the white blood picture to intestinal helminth infestations in cats (*felis domestica*). **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift Journal**, v. 84, p. 436-437, 1971.

RUBEL, D., ZUNINO, G., SANTILLÁN, G., WISNIVESKY, C. Epidemiology of *Toxocara canis* in the dog population from two areas of different socioeconomic status, Greater Buenos Aires, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v, 115, p.275-286, 2003.

RUDOLPHI, C. A. Entozoorum sive intestinalium historic/, naturalis, 1809.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

SCAINI, C.J., DE TOLEDO, R.N., LOVATEL, R., DIONELLO, M.A., DOS ANJOS GATTI, F., SUSIN, L., SIGNORINI, V.R. Environmental contamination by helminth eggs and larvae in dog feces from central area of Cassino beach, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p.617-619, 2003.

SCHOENARDIE, E.R., SCAINI, C.J., BROD, C.S., PEPE, M.S., VILLELA, M.M., MCBRIDE, A.J., BORSUK, S., BERNE, M.E. Seroprevalence of Toxocara infection in children from southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, p.537-539, 2013.

SCHOLZ, T., UHLIROVA, M., DITRICH, O. Helminth parasites of cats from the Vientiane province, Laos, as indicators of the occurrence of causative agents of human parasitoses. **Parasite**, v. 10, p. 343–350, 2003.

SCOTHORN, M.W., KOUTZ, F.R., GROVES, H.F. Prenatal *Toxocara canis* infection in pups. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.146, p.45-48, 1965.

SCHRANK, F. VON P. Verzeichnisse der bisher hindnglich bekannten Eingeweidemiirmer nebst einer Abhandlung uber ihre Anverwandtschaften, 1788.

SHARBATKHORI, M., MIRHENDI, H., JEX, A.R., PANGASA, A., CAMPBELL, B.E., KIA, E.B., ESHRAGHIAN, M.R., HARANDI, M.F., GASSER, R.B. Genetic categorization of *Echinococcus granulosus* from humans and herbivorous hosts in Iran using an integrated mutation scanning-phylogenetic approach. **Electrophoresis**, v. 30, p.2648-2655, 2009.

SHARGHI, N., SCHANTZ, P.M., CARAMICO, L., BALLAS, K., TEAGUE, B.A., HOTEZ, P.J. Environmental exposure to *Toxocara* as a possible risk factor for asthma: a clinic-based case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p.111-116, 2001.

SHARIF. M., DARYANI. A., BARZEGAR, G., NASROLAHEI, M., KHALILIAN, A. Seroprevalence of toxocariasis in schoolchildren in northern Iran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, p.180-184, 2010.

SHETTY, A.K., AVILES, D.H. Nephrotic syndrome associated with *Toxocara canis* infection. **Annals of tropical paediatrics**, v. 19, p.297-300, 1999.

SMITH, H.V., NOORDIN, R. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In Holland and Smith *Toxocara: the enigmatic parasite*, **CABI Publishing**, Oxfordshire, p. 89-112, 2006.

SORIANO, S.V., PIERANGELI, N.B., ROCCIA, I., BERGAGNA, H.F., LAZZARINI, L.E., CELESCINCO, A., SAIZ, M.S., KOSSMAN, A., CONTRERAS, P.A., ARIAS, C., BASUALDO, J.A. A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban

and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 167, p.81-85, 2010.

SPRENT, J.F.A. Observations on the systematics of ascaridoid nematodes pp. 303-319 in Stone, A.R., Platt, H.M., Khalil, L.F. (Eds) Concepts in nematode systematics. - **Systematics Association Special Volume n.22**. London, Academic Press, 1983.

SPRENT, J.F.A. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. **Parasitology**, v.48, p.184-209, 1958.

SPRENT, J.F.A. Parasites lost? **International Journal for Parasitology**, v. 22, p. 139-151, 1992.

SPRENT, J.F.A. The life history and development of *Toxocara cati* (Shrank 1788) in the domestic cat. **Parasitology**, v. 46, p. 54-78, 1956.

SPRENT, J.F.A., The life history and development of *Toxascaris leonina* (von Linstow 1902) in the dog and cat. **Parasitology**, v. 49, p. 330-371, 1959.

STEVENSON, L.A., GASSER, R.B., CHILTON, N.B. The ITS-2 rDNA of *Teladorsagia circumcincta*, *T.trifurcata* and *T. davtiani* (Nematoda: Trichostrongilydae) indicates that these taxa are one specie. **International Journal of Parasitology**, v.26, p.1123-1126, 1996.

STILES, C.W., BROWN, G. The present status of the parasitic nematode family Ascaridae. **Public Health Reports**, v.39, p.1957-1962, 1924.

STILES, C.W., HASSAL, A. The determination of two generic types and a list of roundworm genera with their original and type species. **Bulletin of U.S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry**. v.79, 1095.

STRUBE, C., HEUER, L., JANECEK, E. *Toxocara* spp. Infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**, v.193, p. 375-389, 2013.

SZABOVA, E., JURIS, P., MITERPÁKOVÁ, M., ANTOLOVÁ, D., PAPAJOVÁ, I., SEFCIKOVÁ, H. Prevalence of important zoonotic parasites in dog populations from the Slovak Republic. **Helmintology**, v. 44, p.170-176, 2007.

TAIRA, K., SAITOH, Y., KAPEL, C.M. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens. **Veterinary Parasitology**, v.180, p. 287-29, 2011.

TAN, L., WU, S., ABDULLAHI, A.Y., YU, X., HU, W., SONG, M., SHI, X., LI, G. PCR-RFLP method to detect zoonotic and host-specific *Giardia duodenalis* assemblages in dog fecal samples. **Parasitology Research**, v. 115, p. 2045-2050, 2016.

TARIQ, S.M., MATTHEWS, S., STEVENS, M., RIDOUT, S., HAKIM, E.A., HIDE, D.W. Epidemiology of allergic disorders in early childhood. **Pediatric Pulmonology – Supplement**, v.16, p.69, 1997.

TAYLOR, M. A. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 742, 2010.

TAYLOR, R.M. **Ocular Toxocariasis** C.V. Holland, H.V. Smith (Eds.), *Toxocara: The Enigmatic Parasite*, Oxfordshire, p. 127-144, 2006.

TEIXEIRA, C.R., CHIEFFI, P.P., LESCANO, S.A., DE MELO SILVA, E.O., FUX, B., CURY, M.C. Frequency and risk factors for **toxocariasis** in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 251-255, 2006.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY AND PUBLIC HEALTH. **Toxocariasis**, Iowa State University, 2016.

TREJO, C.A., ROMERO NÚÑEZ, C., GARCÍA CONTRERAS ADEL, C., MENDOZA BARRERA, G.E. Soil contamination by *Toxocara* spp. eggs in a university in Mexico City. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, p.398-300, 2012.

TURCEKOVA, L., DUBINSKY, P. Differentiation between *Toxocara canis* and *T. cati* using restriction profiles and ribosomal gene probe. **Helmintology**, v. 33, p. 223-225, 2006.

TURRIENTES, M.C., PEREZ DE AYALA, A., NORMAN, F., NAVARRO, M., PEREZ-MOLINA, J.A., RODRIGUEZ-FERRER, M., GARATE, T., LOPEZ-VELEZ,

R. Visceral Larva Migrans in immigrants from Latina America. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1263-1265, 2011.

URQUHART, G. M., J. ARMOUR, J. L. DUNCAN, A. M. D., JENNINGS, F.W. **Veterinary Parasitology**, 2nd edition, Blackwell Science Ltd, Blackwell, p.196, 1996.

VANPARIJS, O., HERMANS, L., VAN DER FLAES, L. Helminth and protozoan parasites in dogs and cats in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v.38, p.67-73, 1991.

WANG, C.R., QIU, J.H., ZHAO, J.P., XU, L.M., YU, W.C., ZHU, X.Q. Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the People's Republic of China. **Parasitology Research**, v. 99, p. 627-630, 2006.

WEBSTER, G., On prenatal infection and the migration of *Toxocara canis* Werner, 1782, in dogs. **Canadian Journal of Zoology**, v. 36, p. 435-440, 1958.

WERNER, P. C. F. Vermium intestinalium brevis expositionis continuation. **Lipsiae**, v.28, p. 8-9. 1782.

WOLSTENHOLME, D.R. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicellular animals. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, p.918-925, 1992.

WICKRAMASINGHE, S., YATAWARA, L., RAJAPAKSE, R.P., AGATSUMA, T. *Toxocara vitulorum* (Ascaridida: Nematoda): mitochondrial gene content, arrangement and composition compared with other *Toxocara* species. **Molecular and Biochemical**

Parasitology, v. 166, p. 89–92, 2009.

WILLINGHAM, A.L., OCKENS, N.W., KAPEL, C.M., MONRAD, J. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. **Journal of Helminthology**, v. 70, p.259-263, 1996.

WORLEY, G., GREEN, J.A., FROTHINGHAM, T.E., STURNER, R.A., WALLS, K.W., PAKALNIS, V.A., ELLIS, G.S. JR. *Toxocara canis* infection: clinical and epidemiological associations with seropositivity in kindergarten children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 149, p.597-597, 1984.

XHAXHIU, D., KUSI, I., RAPTI, D., KONDI, E., POSTOLI, R., RINALDI, L., DIMITROVA, Z.M., VISSER, M., KNAUS, M., REHBEIN, S. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. **Parasitology Research**, v. 108, p.341-353, 2011.

YAMAGUTI, S. Studies on the helminth fauna of Japan. **Journal of Helminthology**, p. 217-228, 1961.

YANG, R., JACOBSON, C., GORDON, C., RYAN., Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* species in pre-weaned sheep in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 19-24, 2009.

ZIBAEI, M., SADJJADI, S.M., SARKARI, B. Prevalence of *Toxocara cati* and other intestinal helminths in stray cats in Shiraz, Iran. **Tropical Biomedicine**, v.24, p.39-43, 2007.

ZHU, X.Q., GASSER, R.B. Single-strand conformation polymorphism (SSCP)-based mutation scanning approaches to fingerprint sequence variation in ribosomal DNA of ascaridoid nematodes. **Electrophoresis**, v. 19, p. 1366-1373, 1998.

ZHU, X.Q., JACOBS, D.E., CHILTON, N.B., SANI, R.A., CHENG, N.A.B.Y., GASSER, R.B. Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. **Parasitology**, v. 117, p. 155-164, 1998.

ZHU, X.Q., GASSER, R.B., CHILTON, N.B., JACOBS, D.E. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. **Journal of Helminthology**, v. 75, p. 101-108, 2001.