



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Pesquisa de genes de resistência aos benzimidazóis em *Toxocara* spp.

Uma abordagem *One Health*

Rita Costa de Sousa Calouro

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE TROPICAL

OUTUBRO, 2022



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Pesquisa de genes de resistência aos benzimidazóis em *Toxocara*
spp.

Uma abordagem *One Health*

Autor: Rita Costa de Sousa Calouro

Orientador: Professora Doutora Ana Afonso

Coorientador: Professora Doutora Silvana Belo

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção
do grau de Mestre em Medicina Tropical

*É o tempo da travessia
E, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado,
para sempre, à margem de nós mesmos.*
(Fernando Pessoa)

Agradecimentos

Aos *Schistosomas* da minha vida, que são sem dúvida o que melhor levo destes anos.

À minha família, pelo tempo que lhes “roubei”. Especialmente aos meus filhos, Maria; Manel, Kiko e Vasquinho.

Ao Pedro, que me incentivou a começar e a não desistir.

À minha mãe e à Filipa, pela companhia durante meses e meses....

À “melhor turma de sempre”.

A todos do INIAV, que me acolheram e me ensinaram, principalmente ao Doutor Jacinto Gomes e à Doutora Helga Wapp.

À Professora Isabel Maurício pelas explicações sobre filogenética e pela ajuda na decisão das conclusões da investigação.

Por último, à razão desta investigação, o meu obrigada à Professora Ana Afonso e à Professora Silvana Belo.

Resumo

A Toxocarose é uma parasitose com elevada expressão a nível mundial. Estudos recentes estimam que 1,4 mil milhões de pessoas estarão infetadas ou foram expostas ao parasita *Toxocara* spp.

A doença apresenta principal incidência na idade pediátrica, estando frequentemente associada a deficit cognitivos e a baixa *performance* escolar em crianças. Apesar de pouco frequentes, podem ocorrer sinais clínicos mais graves, contribuindo para situações de morbilidade devastadoras.

A infeção no Homem ocorre maioritariamente por ingestão de ovos embrionados, presentes no solo, contaminado por fezes de cão ou gato e em alimentos não lavados. A ingestão de larvas encapsuladas nos tecidos de hospedeiros paraténicos é também uma possível forma de infeção.

Os benzimidazóis são, até ao momento, os fármacos de eleição no combate a esta parasitose, quer em animais de companhia quer em seres humanos.

A resistência aos antihelmínticos tem sido descrita nos vários continentes desde há alguns anos, com particular incidência na última década. Este fato, agravado pelo desenvolvimento limitado de novas moléculas, coloca em risco o controlo desta zoonose. Fatores genéticos, biológicos, mas principalmente fatores operacionais (como as desparasitações em massa associadas a doses sub-terapêuticas) determinam o desenvolvimento da resistência dos parasitas a estes fármacos.

A maior acessibilidade e a utilização cada vez mais recorrente a técnicas de biologia molecular vieram permitir uma nova abordagem à origem dos mecanismos envolvidos no processo de resistência, bem como na identificação molecular das espécies. Polimorfismos de Nucleótidos Simples nos codões 167,198 e 200 no gene da β tubulina são identificados em vários trabalhos científicos publicados, como sendo os principais responsáveis pela resistência aos antiparasitários, entre os quais se encontram os benzimidazóis. Estes marcadores genéticos têm sido descritos em várias espécies de nemátodes e constituíram a base deste estudo: identificar alterações genéticas associadas ao fenómeno da resistência, em parasitas adultos e ovos, encontrados na prática clínica comum.

A análise molecular realizada neste estudo, em amostras de ovos e vermes adultos de *Toxocara* spp. mostrou que existe uma heterogeneidade genética nos genes NAD e COX/COI utilizados comumente para identificação filogenética de *Toxocara canis* e *Toxocara cati*.

As alterações identificadas no alinhamento das bases na sequência dos genes analisados, resultantes de mutações ao longo de gerações de parasitas, podem indiciar uma maior probabilidade de resistências a fármacos.

Os genes mitocondriais, como o caso do NAD, COX/COI apresentam uma probabilidade de mutação reduzida, pelo que a sua existência nestes parasitas revela que podemos estar perante uma pressão de fármaco algures nos seus ascendentes. No entanto não foi possível determinar a sequência completa do gene da β -tubulina, fato que limita a evidência de resistência destes parasitas aos compostos benzimidazólicos, sendo fundamental continuar a investigação no sentido de associar características fenotípicas de resistência (em animais de companhia e/ou seres humanos) aos marcadores genéticos estudados no gene da β tubulina.

Palavras chave: Benzimidazóis, Resistência, *Toxocara* sp. NAD, COX, COI

Abstract

Toxocarosis is a highly prevalent parasitic disease worldwide. Recent studies estimate that 1.4 billion people are infected or have been exposed to the *Toxocara* spp parasite.

The disease has a higher incidence in pediatric age and is often associated with cognitive deficits and poor school performance in children. Although uncommon, more severe clinical signs may occur, contributing to devastating morbidity situations.

Human infection occurs mostly due to embryonated egg intake, present in soil contaminated by dog or cat feces and in unwashed food. Ingestion of encapsulated larvae in the tissues of paratenic hosts is also a possible way of infection.

Benzimidazoles are, so far, the drugs of choice in fighting this parasitosis, both in pets and in humans.

Resistance to anthelmintics has been described in several continents for some years, with particular incidence in the last decade. This fact, aggravated by the limited development of new molecules, puts the control of this zoonosis at risk. Genetic, biological, but mainly operational factors (such as mass deworming associated with sub-therapeutic doses) determine the development of parasite resistance to these drugs.

The increased accessibility and use of molecular biology techniques has allowed a new approach to the origin of the mechanisms involved in the resistance process, as well as the molecular identification of species. Single nucleotide polymorphisms at codons 167, 198 and 200 in the β -tubulin gene have been identified as being primarily responsible for resistance to antiparasitic drugs, among which are benzimidazoles. These genetic markers have been described in several species of nematodes and were the basis of this study: to identify genetic changes associated with the phenomenon of resistance, in adult parasites and eggs, found in common clinical practice.

The molecular analysis performed in this study showed that there is a genetic heterogeneity in the nad COX and COI genes commonly used for phylogenetic identification of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*.

The changes identified in the alignment of bases in the sequence of the analysed genes, which are the result of mutations over generations of parasites, may indicate an increased likelihood of drug resistance.

Mitochondrial genes such as nad COX and COI have a low probability of mutation so, their existence in these parasites reveal we may be facing a drug pressure somewhere in its ascendants. However, it was not possible to determine the complete sequence of β -tubulin gene, a fact that limits the evidence of resistance of these parasites to benzimidazoles being essential to continue further research to associate phenotypic characteristics of resistance (in pets and/or humans) with the genetic markers studied in the β -tubulin gene.

Key words: Benzimidazoles, Resistance, *Toxocara* sp. NAD, COX, COI

Índice

1. Introdução	11
1.1. Distribuição e Epidemiologia – Fatores de risco.....	12
1.2. O parasita, caracterização e características morfológicas.....	13
1.3. O ciclo de vida do parasita.....	16
1.4. Análise filogenética.....	18
1.4.1 Caraterização molecular.....	19
1.5. Aspetos clínicos.....	19
1.5.1. Aspetos clínicos em animais de companhia.....	19
1.5.2. Aspetos clínicos em humanos.....	20
1.6. Tratamento.....	22
1.6.1. No Hospedeiro Definitivo, o cão e o gato.....	22
1.6.2. No Homem.....	22
1.7. Os benzimidazois.....	23
1.8. Resistências.....	25
1.9. Coinfeção com outros parasitas.....	26
2. Objetivos	28
2.1. Objetivos gerais	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. Material e Métodos	31
3.1. Local e período do estudo.....	32
3.2. Metodologia.....	32
3.2.1. Colheita das amostras.....	32
3.2.2. Tratamento das amostras.....	33
3.3. Extração de DNA	34
3.4. Quantificação de DNA	36

3.5. PCR.....	37
3.6. Electroforese.....	39
3.7. Purificação das amostras.....	40
3.8. Nova eletroforese.....	40
3.9. Sequenciação.....	41
4. Resultados e discussão.....	43
4.1. Amostras obtidas de cães e gatos	44
4.2. Coinfeção com outros parasitas.....	44
4.2. Caraterização filogenética.....	44
5. Conclusões.....	64
6. Referências Bibliográficas.....	66
7. Anexos.....	73
Anexo 1- Tabela 3 - Caraterização das amostras.....	73
Anexo 2 - Tabela 4 - Quantificação de DNA.....	75

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Seroprevalência (estimada) de <i>Toxocara</i> no mundo.....	12
Figura 2. Ovo de <i>Toxocara canis</i>	14
Figura 3. Ovo de <i>Toxocara cati</i>	14
Figuras 4. Parasita adulto em fezes de gato.....	15
Figura 5. Parasita adulto em fezes de cão.....	15
Figura 6. O ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i> e de <i>Toxocara cati</i> - CDC.....	16
Figura 7. Cartaz de desparasitação em massa numa escola no Sul de São Tomé e Príncipe em Fevereiro de 2019.....	24
Figura 8. Árvore genética amostra 2, gene NAD.....	46
Figura 9. Árvore genética amostra 2, gene COX.....	47
Figura 10. Árvore genética amostra 2, gene COL.....	48
Figura 11. Árvore genética amostra 62, gene COX.....	49
Figura 12. Árvore genética amostra 62, gene COL.....	50
Figura 13. Árvore genética amostra 35, gene COX.....	51
Figura 14. Árvore genética amostra 35, gene COL.....	52
Figura 15. Árvore genética amostra 45, gene COX.....	53
Figura 16. Árvore genética amostra 45, gene COL.....	54
Figura 17. Árvore genética amostra 51, gene NAD.....	55
Figura 18. Árvore genética amostra 51, gene COX.....	56
Figura 19. Árvore genética amostra 51, gene COL.....	57
Figura 20. Sequência gene NAD para as amostras 4, 2 e 51.....	61
Figura 21. Sequência COX para as amostras 4, 2, 62, 45, 35 e 51.....	63
Figura 22. Sequência COX para as amostras 4, 35, 45, 2 e 62.....	63

Tabela 1 - Otimização das temperaturas na fase de <i>annealing</i> no processo de PCR.....	38
Tabela 2 - Características fenotípicas da superfamília Ascaridoidea, família Ascarididae.....	45
Tabela 3 - Caracterização das amostras colhidas (anexo 1)	75
Tabela 4 - Quantificação de DNA das 96 amostras (05-05-2021) (anexo 2)	76
Tabela 5 - Identidade do gene NAD para as amostras 4,2 e 51.....	58
Tabela 6 - Identidade do gene/subunidade COX para as amostras 4, 2, 62, 45, 35 e 51..	59
Tabela 7 - Identidade do gene COX/subunidade para as amostras 4,35,45,2,62 e 51.....	5

Abreviaturas

BZs - Benzimidazois

CDC – Centers for diseases control and prevention

rDNA – Ácido desoxiribonucleico ribossómico

mDNA - Ácido desoxiribonucleico mitocondrial

ESCAPP - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites

HD – Hospedeiro Definitivo

HP – Hospedeiro Paraténico

LVM – Larva migrante visceral

L3 – Larva infetante

NPI - Neglected Parasitic Infections

NT - Neurotoxocarose

PCR – Polimerase Chain reaction

SNC – Sistema nervoso central

SNPs – Polimorfismo de nucleótido único.

STH - Soil- transmitted helminthiases

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Distribuição e Epidemiologia – Fatores de risco

A Toxocarose encontra-se distribuída por todos os continentes (1) (Fig 1). Aproximadamente um quinto da população humana apresenta seropositividade para *Toxocara* spp. (2,3). A seroprevalência em África atinge 37% da população (2), constituindo um crescente problema de saúde pública com especial relevância na região subsariana (4). Em Portugal, a seropositividade encontra-se nos 18,8 % (5,6).

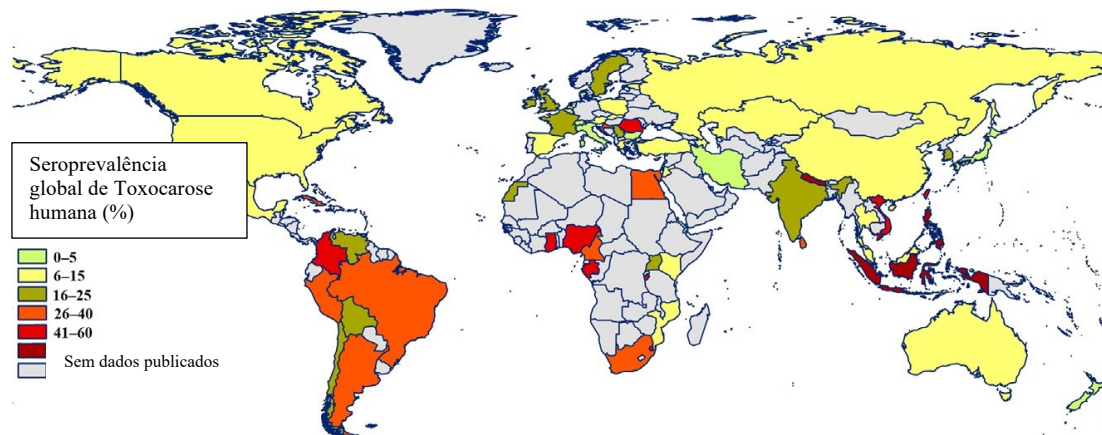


Figura 1- Seroprevalência (estimada) de *Toxocara* no mundo.

Adaptado de Ma ,2020 (6)

A infecção por *Toxocara* spp. está frequentemente associada a condições socioeconómicas desfavoráveis, entre as quais se destacam hábitos de higiene precários e deficientes condições sanitárias (4). A habitação em zonas rurais, o contato direto com o solo e a convivência com animais de estimação (cão e gato) são os fatores de risco mais importantes desta zoonose (4,7).

Em zonas urbanas, os parques infantis, de acesso livre a animais, são muitas vezes utilizados como zonas de passeio de cães, observando-se uma elevada prevalência de ovos de *Toxocara* spp. (8,9). Em zonas tropicais e subtropicais o problema reside no elevado número de cães e gatos errantes, que excretam os ovos do parasita com as fezes, em qualquer lugar, contribuindo para a disseminação generalizada da infecção (9).

A geofagia, frequentemente observada em crianças (4,10), está diretamente associada à infecção por *Toxocara* spp. (7). A contaminação ambiental, corroborada pela elevada prevalência de ovos (extremamente resistentes a condições ambientais severas) presentes em espaços públicos em todo o mundo, contribui para este fato (1, 8, 11).

Uma outra possível e descrita via de infecção, é a presença de ovos no pêlo dos animais domésticos (cão e gato). Os reconhecidos benefícios para a saúde (desenvolvimento cognitivo nas crianças, aumento de atividade física exterior e diminuição de stress pós-traumático) resultam no estreitamento da relação entre animais de companhia e o Homem, aumentando assim o número de animais que convivem diretamente conosco. Este crescente número de animais de companhia nos últimos anos, torna a relação de proximidade Homem - cão/gato um risco crescente de infecção por *Toxocara* spp. (12). Em 2018, 471 milhões de cães e 373 milhões de gatos eram animais de companhia no mundo (13).

1.2. O parasita – classificação e características morfológicas

O gênero *Toxocara* pertence ao filo Nematelminthes, classe Nematoda, ordem Ascaridida, superfamília Ascaridoidea, família Ascarididae e subfamília Toxocarinae (14). Pelo seu potencial zoonótico e pela sua distribuição cosmopolita, *Toxocara canis* e *Toxocara cati* são consideradas as espécies de maior relevância clínica, quer em Medicina Veterinária quer em Medicina Humana (11).

Morfológicamente os ovos de *Toxocara* spp. são oblongos, possuem cápsula espessa e rugosa com dupla membrana medindo 85-90 x75 micrómetros no caso do *T.canis* e 65-75 micrómetros no caso do *T.cati*, apresentando uma forma mais esférica nesta espécie (14) (Figs. 2 e 3).

Os adultos apresentam dimorfismo sexual evidente. O corpo esbranquiçado, não segmentado e cilíndrico, é revestido por uma cutícula de quitina que os torna muito resistentes. A extremidade anterior é caracterizada pela existência de umas expansões cuticulares de diferentes tamanhos e formas, segundo a espécie, que se assemelham a asas, um bulbo glandular esofágico, denominado ventrículo, localizado na junção do esôfago com o intestino e três lábios bem definidos (11). Os machos são mais pequenos

que as fêmeas, possuem uma bolsa copulatória incompleta com espículas na extremidade posterior. *Toxocara canis* (Fig.5) tem a sua extremidade anterior com uma característica forma elíptica, com asas estreitas e semi lanceoladas. Na extremidade posterior possui uma cauda com um processo digitiforme e as respectivas espículas com 0,75-1.3mm, desiguais, curvas e em forma de asa. Os órgãos genitais da fêmea estendem-se anteriormente e posteriormente à região vulvar. Os machos medem 4-10cm e as fêmeas 5-18cm. *Toxocara cati* de dimensões mais reduzidas (Fig. 4), os machos com 3-6cm e as fêmeas com 4-10cm, têm na sua extremidade anterior asas largas, estriadas e em forma de seta. Os machos têm um apêndice terminal estreito e digitiforme e as espículas, que medem cerca de 1,6-2mm de comprimento. A extremidade posterior é semelhante à de *T. canis* (15).

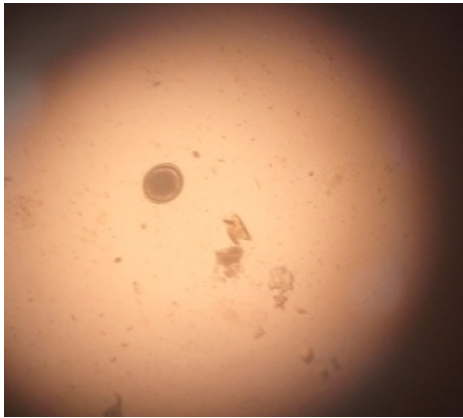


Figura 2- Ovo de *Toxocara canis* (10x)

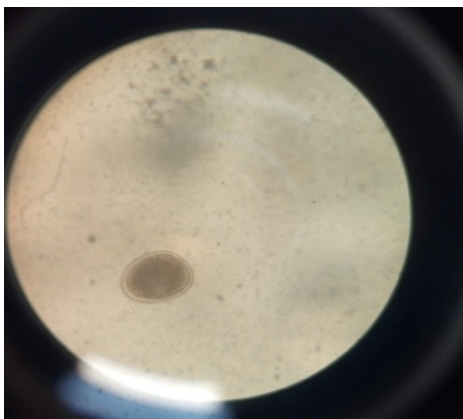


Figura 3 – Ovo de *Toxocara cati* (10x)



Figura 4 – Parasita adulto (extremidade posterior) em fezes de gato

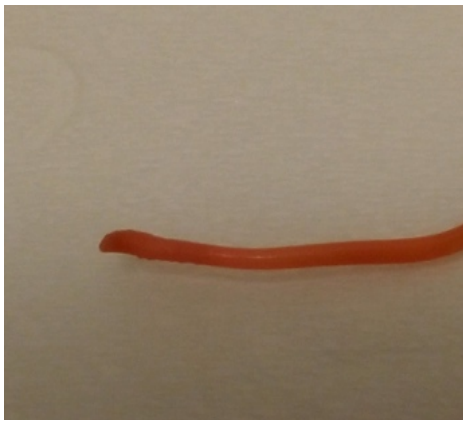


Figura 5 – Parasita adulto (extremidade posterior) em fezes de cão
(fotografias originais de R.Calouro)

1.3. O ciclo de vida do parasita

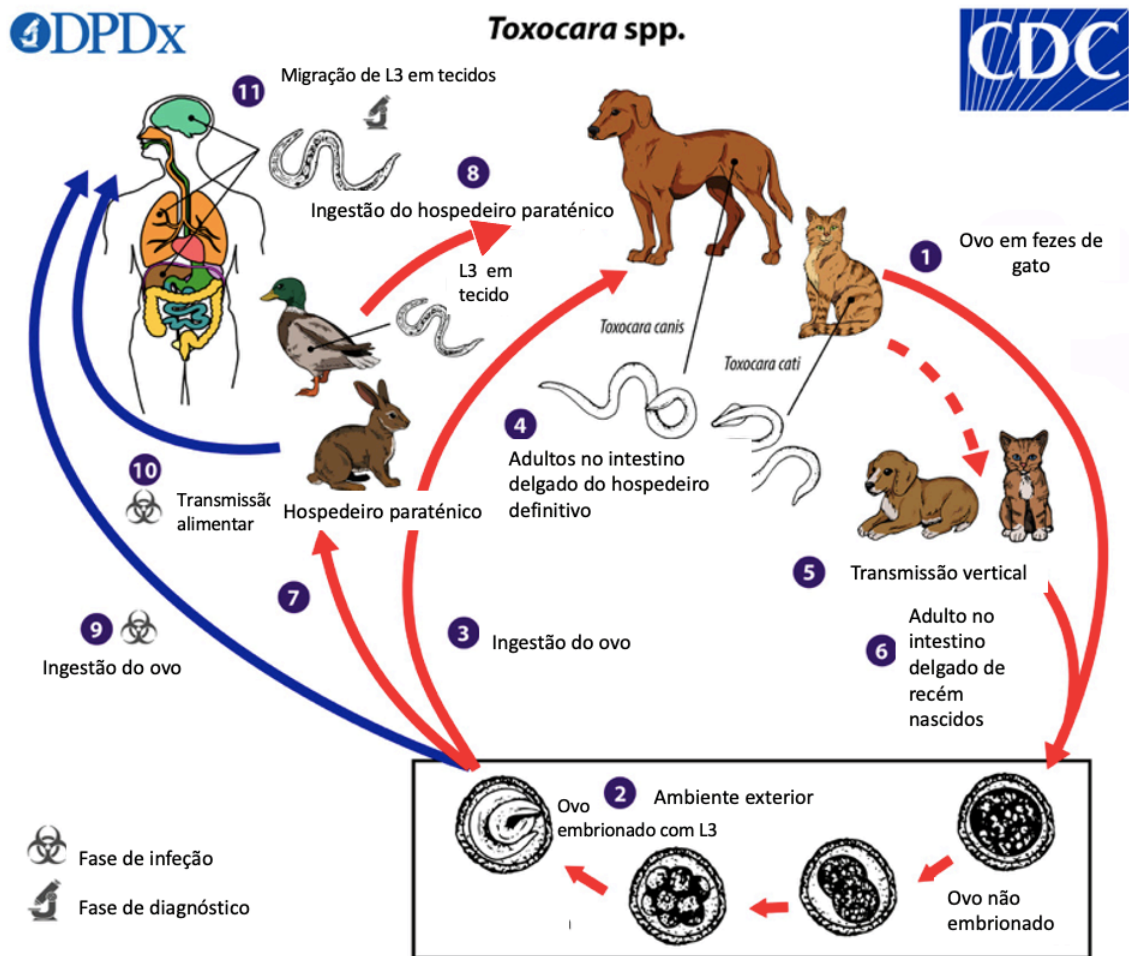


Figura 6– Ciclo de vida: *Toxocara canis* e *Toxocara cati*

Adaptado CDC 2021

Os parasitas adultos vivem no intestino delgado do hospedeiro definitivo (cão ou gato) entre 4 a 6 meses. Após este período de tempo são na sua maioria eliminados espontaneamente. A fêmea produz cerca de 200 000 ovos por dia, muito resistentes nas mais adversas condições ambientais e viáveis por longos períodos de tempo nos solos. Estes ovos, não embrionados aquando da sua excreção nas fezes (possuindo um embrião unicelular) (11), necessitam de condições de temperatura e humidade adequadas (15 a 35°C) para se tornarem infetantes. Isto acontece em 85% dos mesmos num período entre 2 a 6 semanas. Durante a sua maturação o embrião desenvolve-se até ao estágio L3 constituindo esta a forma infetante (16,17).

O HD pode infetar-se de várias formas diferentes (9):

- ° Ingestão de ovos embrionados, diretamente do solo.
- ° Ingestão das larvas presentes nos tecidos de hospedeiros paraténicos
- ° Migração transplacentária (apenas em *T. canis*).
- ° Transmissão lactogénica.

Num período de tempo entre 2 a 4 h após a ingestão do ovo embrionado pelo HD, a L3 eclode no estômago e intestino delgado, migrando através da parede intestinal. Após atingir o fígado pelo sistema porta, chega ao coração através da veia cava caudal e pela artéria pulmonar atinge os capilares pulmonares (em apenas 36h). A partir desta fase existem duas possíveis rotas, dependendo da idade e do estado imunitário do animal: a migração traqueal, em que a larva é deglutida e atinge novamente o intestino delgado pelo esófago; ou a migração somática para os mais diversos órgãos, como o fígado, coração músculos e cérebro permanecendo enquistada sob uma forma latente e infetante.

Os seres humanos (principalmente as crianças) infetam-se pela contaminação direta das mãos e dedos com ovos presentes nos solos ou pelo contato com o HD (principalmente em cães e gatos até aos 6 meses de idade (8,10). Neste caso, como no caso de outros hospedeiros paraténicos, a única via possível das larvas é a migração somática. Nestes hospedeiros o ciclo não se completa e as larvas permanecem nos diferentes tecidos podendo ou não causar complicações clínicas. Ao serem ingeridas, as larvas enquistadas dos HP, podem constituir uma fonte de infeção, quer para os seres humanos, quer para os próprios Hospedeiros Definitivos. Esta via de infeção dos HD é extremamente importante e exclusiva no cão aquando da gravidez. Por ação hormonal, as larvas L3 enquistadas regressam à circulação realizando uma migração transplacentária atingindo os fetos, com uma eficácia de cerca de 100% (16,18). Nos fetos a migração traqueal é completada e os parasitas atingem a sua forma adulta no intestino delgado dos mesmos. Os cachorros começam a excretar ovos nas fezes após as 3 a 4 semanas de vida.

1.4. Análise Filogenética

Toxocara spp. é considerado até à data, como sendo hospedeiro específico. *Toxocara cati* tem como Hospedeiro definitivo exclusivo o gato e *Toxocara canis* tem como Hospedeiro definitivo exclusivo o cão. Há, no entanto, referências a gatos infetados com *T. canis* em que adultos desta espécie foram encontrados em necrópsias de gatos (19). A presença de ovos de *T. cati* nas fezes de cães é mais comum, fato que se explica pelo hábito frequente de coprofagia em cães, sendo a eliminação destes ovos resultante de uma passagem intestinal (20).

A classificação dos nemátodes do género *Toxocara* baseia-se tradicionalmente nas características morfológicas do parasita adulto e ovos. As estruturas identificadas e com maior relevância para a classificação são as estruturas labiais, esôfago, ceco, sistema excretor e a cauda do macho (21). A presença de bulbo esofágico bem como o comprimento e a forma das asas cervicais são frequentemente utilizados para a sua identificação (22). Esta classificação mostrou-se imprecisa e limitada ao longo do tempo, principalmente no que diz respeito a ovos e formas larvares, de mais difícil identificação. A biologia molecular, através da técnica de PCR, permite uma análise e identificação precisas, possibilitando a deteção da diversidade genética tão característica dos parasitas em geral e que é fundamental para a sua adaptação e sobrevivência (15).

Na Malásia, em 2001, foi identificada uma nova espécie de *Toxocara* em gatos, identificada primeiramente como *Toxocara cati*. A análise genética permitiu perceber tratar-se de uma nova espécie denominada à posteriori *Toxocara malayiensis* (23). Clinicamente relevante, esta descoberta poderá ter fortes implicações, uma vez que se acredita que a mesma poderá também ser capaz de desenvolver a forma da larva migrante visceral, as formas ocular e neurológica e ainda a *covert/common* Toxocarose.

A identificação dos parasitas associada a Hospedeiro específico poderá levantar algumas questões relativamente à espécie, sendo cada vez mais importante a caracterização genética das mesmas.

1.4.1. Caracterização molecular

Para a caracterização molecular das diferentes espécies do género *Toxocara* é utilizado DNA ribossómico nuclear e DNA mitocondrial (24).

A primeira e a segunda região espaçadora transcrita interna (ITS-1 e ITS-2, respetivamente) marcadores genéticos do rDNA, são frequentemente utilizadas para a identificação e diferenciação de espécies de *Toxocara*, nomeadamente, *Toxocara canis*, *Toxocara cati*.

No entanto, parece haver maior sensibilidade no que diz respeito à análise do mDNA quer para a análise genética da relação inter-espécies como intra-espécies, dos diferentes ascarídeos (25). O gene mitocondrial, citocromo c oxidase I (COI), com um comprimento aproximado de 650 pares de bases, é comumente usado para identificação de espécies, em estudos evolutivos e ecológicos (26). A subunidade 1 e 2 da região do mDNA, citocromo c oxidase (COX1 e COX2 respetivamente) bem como a subunidade 1 e 4 NADH desidrogenase (NAD1 e NAD 4) também do mDNA, são determinantes no estabelecimento de relações entre *Toxocara* spp. e *Toxascaris* spp. de cães, gatos e ruminantes. Foi a análise destes genes que permitiu a identificação do *Toxocara malayensis* como sendo uma nova espécie (15,25).

1.5. Aspetos clínicos

A Toxocarose é uma zoonose com significativa importância clínica quer nos animais domésticos de companhia (cão e gato) quer em humanos.

Em cães e gatos os sintomas são maioritariamente do foro gastrointestinal, enquanto que que no Homem, a migração larvar pode resultar em alterações graves em vários sistemas: visceral, ocular e neurológico com significativa mortalidade.

1.5.1. Aspetos clínicos em animais de companhia

A infeção por *Toxocara canis* no cão, Hospedeiro Definitivo, é responsável por sinais clínicos moderados a graves como diarreia intermitente ou obstipação, em que

principalmente os cachorros apresentam tipicamente o aspeto de “pot belly”. Estes sinais são resultantes de caquexia, distensão abdominal e atrasos no crescimento. Podem também ser observados sinais respiratórios, como consequência de pneumonia provocada pelo enquistamento das larvas no tecido pulmonar. Em algumas situações de maior carga parasitária, pode mesmo ocorrer a morte por invaginação ou estrangulamento intestinal. Em gatinhos, os sinais clínicos provocados pelo *Toxocara cati*, parasita do qual são Hospedeiro Definitivo, geralmente são semelhantes, mas de menor gravidade. As infeções em animais adultos são tendencialmente menos severas (11).

1.5.2. Aspetos clínicos em humanos

Clinicamente, ambos os parasitas *Toxocara canis* e *Toxocara cati* podem ser responsáveis pelas diferentes formas de toxocarose humana: larva migrante visceral, toxocarose ocular, neurotoxocarose e as formas assintomática ou subclínica (*covert/common*). No entanto, as manifestações clínicas da doença são raras, apesar da infeção ser bastante comum. A duração das migrações larvares, a carga parasitária e a imunidade do hospedeiro determinam a severidade da doença (5,27).

Larva migrante visceral (LMV)

Descrita pela primeira vez em 1952 por Beaver, síndrome LMV, surgiu na sequência de sinais clínicos apresentados por três crianças, resultantes da migração da larva de *Toxocara canis* por vários órgãos internos. A importância clínica desta forma de toxocarose, está diretamente relacionada com as migrações somáticas do parasita, como é o caso mais comum do fígado e pulmões. Assim, febre, anorexia, hepatoesplenomegália, tosse, sibilos pulmonares e dor abdominal são frequentemente descritos na presença da LMV. Outros sinais como polimiosite eosinofílica com mialgias, miocardite e nefrite, podem surgir, refletindo a capacidade migratória da larva, em atingir qualquer órgão. Estão também descritas alterações dermatológicas, como “rash”, prurido, eczema, paniculite, urticaria e vasculite. A LMV ocorre maioritariamente em crianças entre os 2 e os 7 anos de idade, em situações de elevada carga parasitária ou em exposições repetidas ao parasita (28,29,30).

Toxocarose Ocular

A toxocarose ocular ocorre pela resposta inflamatória resultante da migração larvar até ao olho, originando diminuída acuidade visual, edema macular, uveíte ou na sua forma mais grave, cegueira unilateral que pode ou não, estar associada a estrabismo. Anteriormente confundida com retinoblastoma, resultava muitas vezes na enucleação, sendo por isto impreterível o seu correto diagnóstico (31).

Neurotoxocarose

A neurotoxocarose, resulta de lesão cerebral provocada pela migração parasitária através da barreira hematoencefálica. Apesar de frequentemente assintomática, esta migração larvar pode resultar numa forma mais grave com comprometimento do sistema nervoso central (10, 30). São sintomas caraterísticos: cefaleias, febre, fraqueza muscular e convulsões que resultam de meningite, encefalite, mielite, vasculite cerebral e paraparesia. Os sintomas refletem a localização das lesões no SNC. NT é uma condição rara que afeta maioritariamente adultos, contrariamente à LMV que atinge principalmente crianças (32).

Toxocarose Assintomática (*Covert/Common* Toxocarose)

A forma assintomática da toxocarose, é talvez a síndrome mais comum. De expressão clínica menos grave ou subclínica, na maioria das vezes é, por consequência, frequentemente subdiagnosticada. Em adultos é designada por *common* toxocarose e em crianças por *covert* toxocarose, onde os principais sintomas encontrados são linfadenopatias, alterações dermatológicas (como urticária), artralgia e asma (5,33).

1.6. Tratamento

1.6.1. No Hospedeiro Definitivo, o cão e o gato.

Segundo a ESCAAP, os cachorros devem ser tratados com antihelmintico desde as duas semanas de idade e quinzenalmente até aos 14 dias depois de desmamados. Após este tratamento, devem ser feitas desparasitações mensais até aos 6 meses. Nos gatinhos o esquema é semelhante, mas inicia-se apenas às 3 semanas de idade, uma vez que não ocorre transmissão transplacentária.

Nas cadelas gestantes e por forma a reduzir a transmissão aos fetos podem ser administradas lactonas macrocíclicas no dia 40 e no dia 55 de gestação ou fenbendazole desde o dia 40 continuando por mais dois dias pós-parto. Para cães e gatos adultos a ESCAAP recomenda a avaliação individual do risco, sendo aceite um tratamento de quatro vezes por ano. Um tratamento mensal em situação de elevado risco (animais com acesso ao exterior e com contato muito próximo com crianças) está descrito. O período pré patente do *Toxocara* sp. após ingestão das larvas por predação (HP) ou por ingestão de ovos infetantes no solo é de aproximadamente 4 semanas.

Como alternativa para este esquema de tratamentos podem realizar-se testes coprológicos, em intervalos de tempo adequados, seguidos de desparasitação apenas em casos positivos.

1.6.2. No Homem

No que diz respeito ao tratamento da toxocarose não existe consenso; a terapêutica deve ser instituída em doentes sintomáticos, mas a gravidade dos sintomas deve determinar a decisão clínica e neste aspeto existem algumas divergências. Seropositivos saudáveis não devem ser tratados com antihelminticos. As formas oculares e neurológicas devem receber tratamento sintomático (anticonvulsivantes e corticoides) ou uma combinação com o tratamento antiparasitário (31).

Para a larva migrante visceral sintomática o albendazol é o tratamento de eleição, na dose de 400mg duas vezes por dia para adultos; 200mg uma vez por dia durante cinco dias,

para crianças entre um e dois anos; 400mg uma vez por dia, cinco dias com mais de dois anos (34).

Para a Toxocarose ocular e neurotoxocarose, albendazol na dose de 400mg duas vezes por dia, em crianças e 400-800mg duas vezes por dia em adultos; durante 5 a 28 dias. (34)

1.7. Benzimidazóis (BZs)

Os benzimidazóis são uma classe de compostos orgânicos, heterocíclicos e aromáticos com grande aplicabilidade na farmacologia. Hoje em dia, enquanto potentes inibidores enzimáticos, são amplamente utilizados nas mais diversas terapêuticas. São antidiabéticos, anticancerígenos, antimicrobianos, antivirais, antiparasitários, analgésicos e antihistamínicos, mas também utilizados em doenças cardiovasculares, neurológicas, endócrinas, oftalmológicas entre muitas outras (34).

Os benzimidazóis mais utilizados como antiparasitários são o oxibendazol, o fenbendazol, o flubendazol, o mebendazol e o albendazol, sendo os dois últimos, recomendados pelo CDC para o tratamento das formas de Toxocarose Humana (35).

Em Medicina Veterinária o mebendazol (Telmin®Ecuphar), o fenbendazol (Panacur®Intervet ou em associação) e o flubendazol são frequentemente utilizados em cães e gatos (ESCAAP). No entanto, nestes animais, a desparasitação enquanto medida profilática de saúde (ESCAPP), implica, por condicionantes várias, que a mesma seja frequentemente feita “às cegas” (36,37). A elevada prevalência de parasitas de várias classes em cães e gatos, principalmente em animais jovens (37,38,39,40,41), determina o seu uso por vezes indiscriminado, na tentativa de se aumentar o espectro de ação. Em animais de produção a situação é semelhante (42). Por tudo isto são frequentemente utilizadas, em Medicina Veterinária, associações de fármacos, que incluem também os benzimidazóis.

A sua frequente utilização também em Medicina Humana, está diretamente relacionada com as suas características apelativas como, o baixo custo, o largo espectro e a facilidade de administração, sendo por isso a primeira opção em campanhas de desparasitação em massa, sobretudo para geohelmintoses em países tropicais e subtropicais (fig 7).

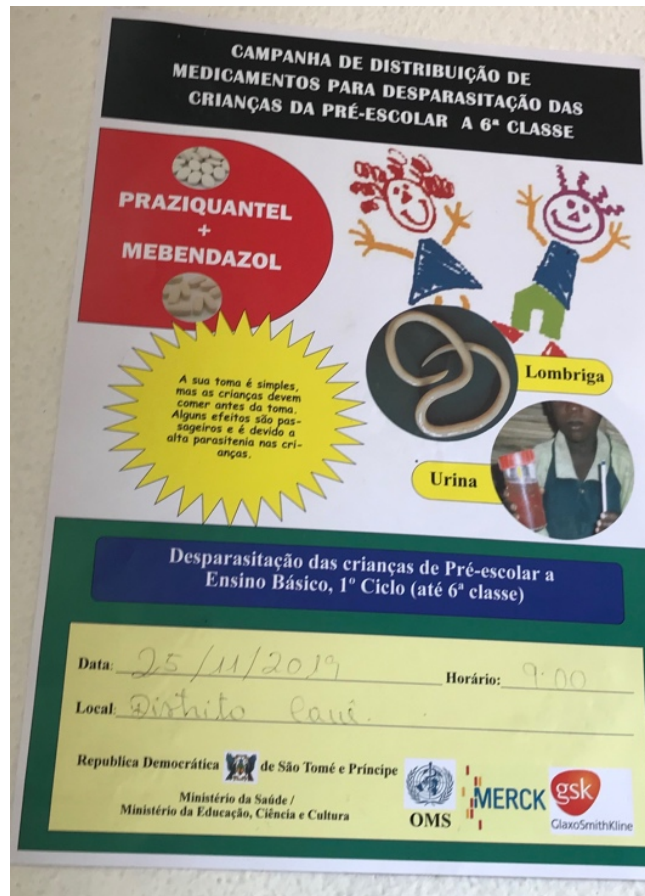


Figura 7- Desparasitação em massa (São Tomé e Príncipe Fevereiro de 2019-fotografia original de R. Calouro)

A introdução dos benzimidazóis enquanto antiparasitários, remonta a 1961, sendo que o albendazol e o mebendazol surgiram nos anos 70, séc.XX (43). A sua utilização, tem sido amplamente difundida quer em Medicina Veterinária quer em Medicina Humana no combate não só a helmintoses, como a Toxocarose, mas também a outras classes de parasitas (34,44).

Relativamente ao seu mecanismo de ação, os BZs apresentam alta afinidade para a β -tubulina, uma proteína membranar, presente nos microtúbulos das células, inibindo a sua polimerização (45). Os microtúbulos, enquanto constituintes do citoesqueleto, possuem funções fundamentais para a sobrevivência das células eucarióticas estando igualmente presentes na membrana mitocondrial e no citoplasma. Participam na mobilidade, divisão (fuso mitótico), transporte de substâncias e secreção de organismos vivos. A formação dos microtúbulos é um processo dinâmico, em que ocorre polimerização numa das suas

extremidades enquanto que na outra ocorre despolimerização. A inibição deste processo impede a absorção e excreção de nutrientes e o bloqueio da entrada de glucose nas células, levando à morte do parasita.

A ligação entre os Bzs e a β -tubulina apresenta uma afinidade 25-400 vezes superior para os nemátodes, comparativamente aos mamíferos. Esta característica faz com que o fármaco seja seletivo para os parasitas não causando toxicidade no Hospedeiro, quer seja Homem, cão ou gato. Existem, no entanto, efeitos teratogénicos descritos no primeiro trimestre de gestação, pelo que a sua utilização está desaconselhada neste período.

1.8. Fármaco-resistências

Apesar da sensibilização junto das comunidades em geral (médica, científica e utentes) e das diversas tentativas de solução para a problemática da resistência a medicamentos, esta esta cresce de forma galopante e preocupante a nível global (46).

Vários fatores estão associados ao aparecimento de resistências dos antiparasitários em geral, como (19):

- o uso abusivo e muitas vezes desnecessário, de anti-helmínticos, em desparasitações periódicas e sem recurso a confirmação de diagnóstico laboratorial;
- desparasitações em massa (Fig.7)
- doses sub-terapêuticas, doses únicas e não adequadas ao peso;
- diagnósticos incorretos;
- ausência de alternância de fármacos eficazes em tratamento;

A pressão do fármaco na população parasitária está diretamente associada ao desenvolvimento de resistências. Este parece ser um fenómeno hereditário, em que o gene ou genes responsáveis, se encontram previamente presentes na população de parasitas. Sendo considerado um fenómeno pré adaptativo, a resistência ocorre mesmo antes da utilização de qualquer antiparasitário, resultando de um processo de seleção.

Em determinadas condições, após a exposição a um anti-helmíntico, os helmintas que transportam os genes responsáveis pela resistência são os que irão sobreviver à ação do fármaco. Ao reproduzirem-se, estes parasitas vão consequentemente aumentando o conjunto de genes que conferem resistência numa população.

A identificação da resistência aos anti-helmínticos surge pela primeira vez no início da década de 60, séc XX (22). Sabe-se hoje em dia, que a β -tubulina é o principal alvo molecular para a resistência dos nematodes aos antihelmínticos, apesar de não ser o único (46). Esta proteína membranar, desempenha um papel vital em inúmeros processos celulares e o comprometimento dos mesmos promove a ineficácia dos referidos fármacos. A existência descrita de SNPs em nemátodes Trichostrongylídeos, no gene da β -tubulina isotipo-1 (16) determina a substituição da Tirosina pela Fenilalanina no codão 200 (F200YSNP). Vários estudos posteriores ao longo do tempo, têm revelado a existência de outros polimorfismos de nucleótido único, nos codões 167 (F167Y) e 198 (E198A) no isotipo 1 da β -tubulina em várias espécies de nemátodes (47): *Haemonchus contortus* (48), Ancilostomídeos (*Necator americanus* e *Ancylostoma brasiliense* com SNPs no codão 198 e 200), *Trichuris trichiura* (mutação no codão 200) e mais recentemente em *Ascaris lumbricoides* (codão 200) (48).

1.9. Co-infecção com outros parasitas

Os nemátodes gastrointestinais, chamados de “vermes redondos” pela sua forma circular no corte transversal do seu corpo, infetam cães e gatos sob a forma de vários géneros e espécies distintas.

As famílias com maior interesse no cão, pela sua patogenicidade para o Hospedeiro Definitivo e potencial zoonótico são as famílias Trichuridae (*Trichuris vulpis*), Ancylostomatidae (com as espécies *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma tubaeforme* e *Uncinaria stenocephala*), e família Ascarididae (com destaque para as espécies *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Toxascaris leonina*) (25).

Relativamente aos gatos, as duas famílias de nemátodes gastrointestinais com particular relevância são: Ancylostomatidae e Ascarididae.

No decorrer da presente investigação foram identificados ovos de *Trichuris vulpus* e *Ancylostoma sp.* como resultado de infeções mistas, nas fezes dos animais analisadas.

A família Trichuridae (representada em clínica de animais de companhia por *Trichuris vulpus*) não apresenta potencial zoonótico e o “verme em forma de chicote” é facilmente distinguido de outros nemátodes. Os seus ovos, presentes nas fezes de cães infetados são caracteristicamente em forma de limão, também facilmente distinguíveis de outros ovos

de nemátodes. *Trichuris trichura*, desta mesma família, parasita do Homem, não infeta cães (60).

Na família Ancylostomatidae, as espécies mais comuns são *Ancylostoma tubaeforme*, *Ancylostoma braziliense* e *Uncinaria stenocephala*, (com potencial zoonótico). O considerável menor tamanho dos parasitas adultos (3-12mm) desta família, permite uma fácil distinção macroscópica relativamente à família Ascarididae não havendo possibilidade de incorreta identificação. Os ovos, de *Ancylostoma* spp. são do tipo estrangilídeo, medem entre 30-45 x 55-76µm e os de *Uncinaria* spp. medem cerca de 70-90 x 40-50µm. A sua forma é oval com uma parede lisa e fina bem distinta dos ovos de *Toxocara* sp.

Os adultos da superfamília Ascaridoidea, à qual pertence a família Ascarididae, têm boca trilabiada, dimensões até 45 cm e o macho sem bolsa copuladora; os ovos são muito resistentes, com uma membrana espessa e com 3 camadas. Nesta família, encontramos 2 subfamílias: Toxocarinae (à qual pertence o género *Toxocara*, objeto deste estudo e também os géneros *Toxascaris* e *Lagochilascaris*) e a subfamília Ascaridinae (à qual pertencem, entre outros, os géneros *Ascaris* e *Parascaris*) cujo HD não são o cão nem o gato e, portanto, sem relevância para o presente estudo. A tabela 2 mostra algumas características relevantes utilizadas para identificação, quer dos parasitas adultos quer dos ovos (14).

Classificação Subfamília/género	Espécie	Adultos (cm)	Ovos	HD	Potencial zoonótico
Toxocarinae					
..Toxocara	<i>T. canis</i>	4-10	85-90 x 75µm esféricos	Cão	Sim
	<i>T. cati</i>	3-6	65-70 µm; ovais	Gato	Sim
	<i>T. malayiensis</i>	8-10		Gato	Sim (?)
..Toxascaris	<i>T. leonina</i>	5-10	70-80µm; ovais e translúcidos	Gato	Não
..Lagochilascaris (68)	<i>L. minor</i>	6-15	75-85µm (semelhantes aos de <i>Ascaris lumbricoides</i>)	Felídeos silvestres	Sim (?)
Ascaridinae			Ovais/redondos		
..Ascaris	<i>A. lumbricoides</i>	15-40	Membrana espessa	Homem	Não aplicável
	<i>A. suum</i>	15-45	3 camadas	Porco	Acidentalmente
..Parascaris	<i>P. equorum</i>		75-85µm	Cavalo	Exclusivo de cavalo

Tabela 2 Superfamília Ascaridoidea, família Ascarididae

2.Objetivos

2. Objetivos

Segundo a OMS, a toxocarose, enquanto STH, faz parte da lista das 17 doenças que afetam mais de mil milhões de pessoas no mundo. O CDC identifica a toxocarose larvar como uma das doenças parasitárias negligenciadas Neglected Parasitic Infections (NPI) (49).

Apesar dos esforços da comunidade científica, investigadores, clínicos e agentes de Saúde Pública na diminuição da prevalência e consequente diminuição de morbilidade e mortalidade por toxocarose, existe ainda muito por fazer. Acredita-se que o crescente número de resistência aos fármacos disponíveis está diretamente relacionado com alterações genéticas parasitárias presentes em determinadas populações.

O objetivo deste estudo consistiu na identificação molecular das espécies *Toxocara canis* e *Toxocara cati* e de possíveis mutações genéticas pré-determinadas, com responsabilidade na resistência aos benzimidazóis, fármacos utilizados no combate a esta parasitose.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a diversidade genética em amostras de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* de cães e gatos que permitam a sua identificação, bem como dos genes envolvidos na resistência aos Benzimidazóis,

2.2 Objetivos específicos

- Isolar o máximo de estirpes de *Toxocara* sp. de diferentes Hospedeiros Definitivos (cães e gatos) com diferentes origens e ambientes: casa; rua; meio rural e meio urbano ou ambientes mistos.
- Identificar e analisar filogeneticamente as espécies do género *Toxocara* encontradas em cães e gatos. Identificar pelo menos um dos genes: ITS2 NAD, COX, COI, 18S nas amostras obtidas, por forma a confirmar a identidade dos parasitas isolados.

- Identificar mutações previamente descritas, como as existentes nos codões 167,198 e 200 do gene da β tubulina associadas à resistência a benzimidazóis e potenciais resistências.
- Caracterizar os Hospedeiros definitivos conforme o seu habitat, identificar possíveis resistências aos antiparasitários e relacioná-las com as mutações genéticas encontradas determinando potenciais causas de resistência.

3. Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1 Local e período de estudo

Foram realizadas colheitas de fezes, em cães e gatos, através do Hospital Veterinário de Santarém (HVS) entre os meses de julho e outubro de 2020.

3.2 Metodologia

As amostras de fezes foram observadas macroscopicamente para a identificação das formas parasitárias adultas e microscopicamente para a identificação de ovos.

Após colheita, os parasitas adultos foram lavados com água destilada e conservados em etanol a 70%, em recipiente de plástico e mantidos a 4°C no frigorífico, até processamento. As fezes foram mantidas no recipiente de colheita (frascos de plástico ou sacos de plástico), também no frigorífico a 4°C, sem qualquer adição de conservante. Todas as amostras foram posteriormente tratadas no INIAV (Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária).

3.2.1 Colheita de amostras

Com início em julho de 2020, foram solicitadas amostras de fezes a todos os detentores de animais atendidos no HVS (cães e gatos). A área geográfica abrangida compreende todo o distrito de Santarém, Portugal. Duas amostras (de 2 parasitas adultos) encontravam-se no laboratório de Parasitologia do INIAV (uma de um gato outra de um leão).

Sempre que possível (dependendo da colaboração do tutor) foram realizadas colheitas de fezes (identificados, macroscopicamente, parasitas adultos e microscopicamente, ovos de *Toxocara* spp.) do mesmo animal, antes da desparasitação com pamoato de pirantel e após a sua administração.

O pamoato de pirantel é um antiparasitário, antihelmíntico, com diminuta absorção intestinal: mais de 85% da dose passa inalterada pelo intestino, sendo libertado nas fezes.

Isto torna-o num medicamento praticamente inofensivo para o hospedeiro. Em nemátodes gastrointestinais causam a paralisia do parasita, agindo diretamente no recetor nicotínico da acetilcolina, na superfície do músculo somático. Através da despolarização das junções neuromusculares o Pirantel origina a paralisia irreversível dos parasitas, sendo os mesmos expulsos nas fezes, de forma natural. Uma dose única é suficiente para a desparasitação eficaz (50,51).

3.2.2 Tratamento das amostras

As fezes foram analisadas por dois métodos diferentes, integrando o protocolo de estudo da Dissertação de Mestrado da Dra. Susana Cunha, a decorrer na Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Foi feita a identificação dos ovos pelo método qualitativo de flutuação Willis-Mollay, e pela técnica Mini-Flotac, qualitativa e quantitativa. Optou-se pela realização de ambos os métodos para aumentar a sensibilidade da análise.

Técnica de Flutuação de Willis-Mollay-baseada no princípio de que os ovos de nematodes flutuam numa solução salina a 1:130 e aderem a superfície de vidro após contato com a mesma (52).

Pesaram-se 2 a 5g de fezes, misturaram-se 20 ml de solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl) a 35% (D = 1.20g/dL) e homogeneizou-se a suspensão, com a ajuda de um bastão. De seguida, através de um tamis, o material foi filtrado para um tubo de ensaio, completando-o, até formar um menisco na superfície do mesmo. Foi colocada uma lamela sobre o menisco e deixou-se em repouso por 15 minutos. Retirou-se a lamela e esta foi sobreposta sobre a lâmina. A amostra foi observada ao microscópio ótico, em objetiva 10x.

Mini-Flotack (53) – Técnica de flutuação de maior precisão, baseada na técnica de Flotac mas de maior rapidez e simplicidade de execução .

Pesaram-se 2-5g de fezes, adicionou-se cerca de 15ml de água e homogeneizou-se a solução. Filtrou-se a amostra com uma compressa dobrada em 4 e transferiu-se a mesma para um tubo que foi centrifugado a 1500 r.p.m. durante 3 minutos. Descartou-se o

sobrenadante e preencheu-se o tubo com FS. Encheu-se a câmara Mini-Flotac e procedeu-se à contagem dos ovos com a ajuda do microscópio ótico.

Após a identificação de ovos de *Toxocara* spp. nas fezes, os animais foram tratados com pamoato de pirantel para libertarem os adultos nas fezes e proceder-se à sua análise filogenética.

3.3 Extração de DNA

As extracções de DNA foram feitas a partir dos dois tipos de amostras colhidas: ovos e adultos de *Toxocara* spp. de Cão e Gato.

3.3.1 Preparação das amostras

Fezes – Purificação e conservação dos ovos de *Toxocara* sp.

- 1) Pesou-se 5g de fezes num copo de vidro.
- 2) Num volume de 45ml de solução saturada de NaCl, homogeneizou-se a suspensão.
- 3) Através de um crivo, transferiu-se a suspensão para um tubo de Falcon.
- 4) Centrifugou-se a 2000 r.p.m. durante 3 minutos.
- 5) Através de um filtro de 25 um passou-se o sobrenadante e lavaram-se os ovos retidos no filtro (com água corrente da torneira).
- 6) Colheram-se os ovos do filtro com a ajuda de uma pipeta de Pasteur descartável, aspirando-os com pequenos volumes de água para um tubo de Falcon de 15ml.
- 7) Centrifugou-se a suspensão de ovos a 200 r.p.m. durante 3 minutos.
- 8) Aspirou-se parte do sobrenadante, deixando o sedimento contendo os ovos com 5ml do sobrenadante no tubo.
- 9) Ressuspendeu-se e transferiu-se a suspensão para um gradiente de açúcar, para purificar os ovos.
- 10) Centrifugou-se o gradiente de açúcar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos.
- 11) Colheram-se os ovos do filtro com uma pipeta de Pasteur descartável, aspirando-os com pequenos volumes de água para um tubo de Falcon de 15ml.

- 12) Centrifugou-se a suspensão dos ovos a 200 r.p.m. durante 3 minutos.
- 13) Retirou-se o sobrenadante até aproximadamente 1,5ml, ressuspendeu-se o sedimento e transferiu-se a suspensão com os ovos para criotubos.
- 14) Centrifugaram-se os ovos nos criotubos e retirou-se o sobrenadante de modo a ficar o equivalente a um volume de 200 ul.
- 15) Conservou-se no congelador.

Parasitas Adultos

Os parasitas adultos foram colocados individualmente em tubos *eppendorf* de 2ml. Foram fragmentados com a ajuda de um bisturi para facilitar a digestão enzimática dos mesmos e macerados com uma “seta de plástico”.

As técnicas moleculares, baseadas fundamentalmente em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) requerem o isolamento de DNA genómico, com o maior grau de pureza possível. As técnicas de extração devem evitar a degradação do DNA pelas DNases (pH7), eliminar polissacarídeos, ou outros compostos secundários que possam danificar o DNA (54).

Estão descritos vários métodos de extração de DNA, com protocolos que permitem a obtenção de um DNA puro e intacto (55,56). Neste estudo foi usado o protocolo CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), frequentemente utilizado na extração de DNA em tecidos vegetais (57). A extração de DNA nas células vegetais é mais difícil do que na maioria das células animais, pelo fato de possuírem parede celular (com componentes como, celulose, peptidoglicanos e quitina). Em nemátodes a presença de colagénio na rígida cutícula externa (58) pode dificultar a extração de DNA, pelo que se optou pela utilização de um método mais eficiente, para estruturas de maior rigidez.

O CTAB (pH8) é um detergente catiónico que solubiliza as membranas celulares (e também as paredes celulares vegetais), formando um complexo com o DNA que facilita a sua precipitação diferencial. É utilizada também neste método de extração, a proteinase K cuja função consiste na separação do DNA das proteínas da cromatina. Para a separação entre ácidos nucleicos e proteínas usa-se o clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) que, ao desnaturar as proteínas, torna-as insolúveis em fase aquosa (onde se encontram os ácidos

nucleicos). Por último, o etanol a 70%, por desidratação do DNA, promove a sua precipitação. O TrisEDTA dissolve o precipitado para leitura por espectrofotometria.

Após os processos físico de fracionamento dos parasitas adultos procedeu-se à extração:

- 1) A cada tubo *ependorf*, adicionou-se 600 µl de tampão CTAB.
- 2) Adicionou-se 10 µl de proteinase K.
- 3) Homogeneizou-se (Vórtex).
- 4) Incubou-se a amostra no termomixer a 70°C, com agitação permanente por 2h.
- 5) Congelou-se a amostra por 24h.
- 6) Adicionou-se 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), após descongelamento ao ar.
- 7) Agitou-se 2 minutos no Vórtex.
- 8) Centrifugou-se 12000 r.p.m. 5' e retirou-se sobrenadante para novos tubos.
- 9) Adicionou-se 200 µl de etanol absoluto gelado (precipitação da amostra).
- 10) Congelou-se 2-24h.
- 11) Centrifugou-se durante 20 minutos a 1300 rpm.
- 12) Descartou-se sobrenadante.
- 13) Lavou-se o *pellet* com 500 µl de etanol gelado 70%.
- 14) Centrifugou-se durante 10 minutos a 1300 r.p.m.
- 15) Retirou-se e rejeitou-se o sobrenadante.
- 16) Incubou-se na estufa a 55°C durante pelo menos 10 minutos (até secar completamente).
- 17) Adicionou-se 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4).
- 18) Congelaram-se as amostras.

3.4 Quantificação de DNA – Concentração e grau de pureza

As amostras de DNA extraídas no laboratório do INIAV foram avaliadas quanto à sua concentração e ao seu grau pureza por meio da análise da densidade óptica (DO) através da técnica da espectrofotometria. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda 260nm; a quantidade de luz absorvida permite-nos quantificar o DNA. As proteínas absorvem luz no comprimento de onda 280nm, assim a relação entre A260/A280 permite-

nos avaliar a qualidade do DNA das amostras (valores inferiores a 1,8 indicam contaminação).

Diluiu-se, na diluição de 1:50, 10 µL de cada amostra de DNA com 490 µL de água ultra pura.

As leituras realizadas no espectrofotômetro (Nanodrop 2000), no comprimento de onda 260nm e 280nm contam da tabela 4, em anexo.

A relação: 1 DO260 = 50 µg de DNA (o valor de absorvância 1 no comprimento de onda 260 corresponde a 50 µg/ml de DNA de dupla hélice) é usada para estimar a concentração de DNA em cada amostra, utilizando o cálculo seguinte:

$$\text{Concentração de DNA} = \text{leitura da DO260} \times 50 \mu\text{g} \times \text{fator de diluição usado na leitura.}$$

3.5 PCR amplificação de DNA

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem como fundamento a multiplicação de pequenos fragmentos de DNA, permitindo a obtenção de milhões de cópias semelhantes, para a realização de análises genéticas e moleculares.

Para a sua realização são necessários: a amostra de DNA (que contém o segmento a amplificar); nucleótidos (para a síntese de novas cadeias de DNA); a enzima DNA polimerase (catalisadora da reação); o magnésio (co-fator da reação) e os *primers*, pequenas sequências de nucleótidos, conhecidas e complementares à região alvo de DNA. A reação resulta de combinações de temperatura e tempo adequadas, existindo três fases distintas no processo: desnaturação, anelamento e extensão.

Na primeira fase (desnaturação) por ação do calor, a cadeia dupla de DNA separa-se em duas cadeias simples, a 94°C / 95°C. Esta fase possibilita a ligação dos *primers* à região complementar à sua sequência, na amostra de DNA.

Na fase de anelamento a temperatura é reduzida (sendo específica para cada par de *primers*), dependendo principalmente do tamanho do *primer* e da sequência de nucleótidos. Esta temperatura deve ser previamente determinada.

Em seguida, na fase de extensão, com um aumento da temperatura (para cerca de 72°C) a *Taq polymerase*, uma enzima, sintetiza duas novas fitas de DNA, usando a fita original como modelo. Isto resulta na duplicação do DNA original.

Todo o processo é repetido cerca de 40 vezes possibilitando a obtenção das várias cópias de DNA necessárias às análises respetivas (59,60).

No presente trabalho, todas as amostras foram submetidas à técnica de PCR. As regiões relevantes para o estudo filogenético do rDNA e do mDNA anteriormente descritas, foram amplificadas.

Assim, foram desenhados os seguintes *primers* de acordo com as respetivas referências ITS2, nad, cox1, coi, 18S, β tubulina (codão ASC 167,198,200) identificados com as letras A a H para amplificação do DNA (59,60). Sucessivas ampliações foram realizadas para otimização das temperaturas de reação, na fase de anelamento (de acordo com a tabela 1).

As reações foram realizadas num volume total de 25 μ l num mix com a seguinte composição: 11,75 μ l de água pura; 5 μ l de tampão 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl; 2 μ l de Mg²⁺; 3 μ l de dNTP(ACGT); 1 μ l de T5' (*PRIMER*); 1 μ l T3' (*PRIMER*); 0,25 μ l Taq; 1 μ l de DNA a analisar. Para cada *primer* foi preparado um mix diferente. Foram realizados 30 ciclos com o termociclador *T gradient, Biometra*, com as seguintes condições:

- 95 °C durante 5 min; 94 °C durante 30 s, seguidos de 51 °C durante 30 s (temperatura variável consoante o *primer* utilizado), por fim 72 °C durante 30 s e finalmente 72 °C durante 5 min.

Para cada amplificação foram incluídas amostras sem DNA (controlos negativos) para detetar possíveis contaminações.

Após a primeira tentativa da utilização da temperatura de 51°C para todos os *primers* a seleção das temperaturas de anelamento, baseou-se na média das temperaturas recomendadas pelo fabricante para cada *primer* (*front e reverse*). Assim foram utilizadas as seguintes temperaturas (por ordem cronológica de realização) descritas na tabela que se segue:

primers	Temperaturas experimentadas (°C)	Temperaturas médias(°C)	Temperaturas finais(°C)
ITS gato	51;59;55;49	47,30	51
ITS cão	51;56;50;59	55,42	59
nad	51;49;56;55	50,63	55
cox1	51;45;49;56;55	45,42	55
coi	51;49;56	46,36	49
18S	51;53;54;55;49;56;59	57,28	59
β Tubulina	51;55;58;59;49;54;56;53	61,87	59
codão ASC 167	51;54;59	54,93	59
codão ASC 198	51;54;59	56,64	59
codão ASC 200	51;54;59	55,91	59

Tabela 1 – Otimização das temperaturas na fase de *annealing* no processo de PCR.

3.6 Electroforese em Gel de Agarose– análise da amplificação

Utilizou-se a electroforese em gel de agarose para separação e identificação dos fragmentos do DNA.

Pela passagem da corrente eléctrica através do gel de agarose, que contém as moléculas de DNA (de carga eléctrica negativa e diferente peso molecular), ocorre a separação das mesmas. Os ácidos nucleicos, por possuírem carga total negativa (devido ao grupo fosfato), migram sempre em direcção ao polo positivo sendo que os fragmentos com menor peso molecular, deslocam-se mais rapidamente, permitindo a sua separação e subsequente identificação.

Procedimento

- 1) Preparou-se a tina (suporte do gel) de acordo com o número de amostras de DNA a analisar (número de poços igual a número de amostras +1).
- 2) Pesaram-se 4 g de Agarose numa balança digital.
- 3) Mediram-se 200ml de tampão tris–borato–EDTA 1 X (TBE1x) numa proveta e transferiu-se para um balão de Erlenmayer
- 4) Aqueceu-se 3 minutos no micro-ondas (até ficar translúcido).

- 5) Adicionaram-se 8 µl de *Cybergreen ou green safe premiun* (que emitem fluorescência quando ligado ao DNA) e agitou-se.
- 6) Depositou-se na tina e aguardou-se 30 minutos até que o gel solidificasse.
- 7) Transferiu-se para a câmara.
- 8) Encheu-se a câmara com tampão TBE 1x até cobrir o gel por completo e iniciou-se o enchimento dos poços com as diferentes amostras (o primeiro poço foi cheio com um marcador *Ladder* que consiste num padrão de referência que contém fragmentos conhecidos de DNA e que permite a comparação com a amostra).
- 9) Colocaram-se as amostras da esquerda para a direita para a correta identificação das mesmas aquando da leitura adicionam-se a cada uma 8 µl de marcador *Loading* que confere peso e cor.
- 10) Foi aplicada uma corrente de 120V durante 30 minutos.
- 11) Procedeu-se à leitura.

3.7 Purificação das amostras

A purificação das amostras consiste na remoção de contaminantes como lípidos, proteínas, hidratos de carbono, oligoelementos e RNA (61).

No presente estudo utilizou-se o QIAGEN® PCR Purification Kit. Este Kit comercial, permite a passagem da amostra por uma coluna de purificação (carregada positivamente), onde o DNA fica retido pela atração da sua carga negativa. A eluição do DNA retido é conseguida através de um tampão EB (10mM Tris CL,pH 8.5) e a amostra é transferida para um tubo, sendo assim desprezados os contaminantes existentes.

Este protocolo permite a purificação de 10 µg de produtos de PCR (com tamanho de 100 bp a 10Kb). Ao tampão PE deve ser adicionado etanol (90-100%). Ao tampão PB deve ser adicionado um indicador de pH (1:250).

Procedimento

- 1) Identificaram 2 tubos *eppendorf* de 1,5ml por cada amostra.
- 2) Marcaram-se as respetivas colunas.

- 3) Adicionou-se 80 µl de tampão PB a 16 µl de cada amostra.
- 4) Transferiram-se as amostras para os tubos contendo as colunas de purificação.
- 5) Centrifugou-se a 13000 r.p.m., 2 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Adicionou-se 750 µl de Tampão PE e centrifugou-se novamente (13000 r.p.m. a temperatura ambiente).
- 7) Descartou-se o líquido que passou através do filtro e que encontrava na parte de baixo do tubo.
- 8) Centrifugou-se a 13000 r.p.m., 2 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Descartou-se novamente o resíduo e o respetivo tubo da coluna.
- 10) Em novos *ependorfs* já identificados (passo1), foram colocadas as colunas de purificação e foi adicionado 50 µl de tampão EB para eluição do DNA.
- 11) Centrifugou-se a 13000 r.p.m., 2 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Obteve-se a amostra de DNA purificada.

3.8 Eletroforese

O processo foi repetido, como descrito anteriormente para análise das amostras após purificação.

3.9 Sequenciação

Após a realização dos procedimentos supra descritos, procedeu-se ao envio para sequenciação de 25 amostras, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa. As amostras foram selecionadas com base em critérios de valor analítico e relevância para o assunto em estudo.

Após a extração de DNA, quantificação, purificação e amplificação do mesmo, com resultados considerados aceitáveis, comprovados pela electroforese em gel de agarose, foram sequenciados os genes/região genómica ITS2 gato, ITS2 cão, 18S, e β Tubulina (codão ASC 167,198,200) provenientes de seis amostras de gatos e duas de cães pelo laboratório Stab Vida - Sequenciação automática.

3.10 Repetição de procedimentos

Foram repetidos todos procedimentos acima descritos para novas amostras após a impossibilidade de sequenciação das amostras anteriores (catorze amostras de 9 animais diferentes, 5 gatos e 4 cães, foram submetidas a novos PCRs)

4. Resultados

4.Resultados e discussão

4.1 – Amostras obtidas de cães e gatos

Foram obtidas noventa e seis amostras (numeradas de 1 a 96 - parasitas adultos e ovos), que no total, correspondiam a dezanove animais (quinze gatos e quatro cães, numerados de 1 a 19).

Das noventa e seis amostras, 91 correspondiam a parasitas adultos e cinco a ovos do parasita.

Apenas uma amostra foi proveniente do vômito de um animal (gato não desparasitado), sendo as restantes noventa e cinco provenientes de fezes.

Relativamente à desparasitação: dez formas parasitárias foram obtidas, antes da toma de qualquer desparasitante (nove parasitas adultos e uma amostra de ovos); em 80 amostras houve desparasitação anterior às colheitas e em seis amostras não foi possível determinar se existia ou não desparasitação prévia.

Das 80 amostras pertencentes a animais desparasitados, sessenta e cinco correspondem a parasitas libertados nas fezes de cães e gatos após a toma de Pamoato de Pirantel na dose de 10mg/kg para ambas as espécies (de acordo com “Veterinary Drugs”, Bsava 2021), sendo sessenta e uma amostras de adultos e quatro amostras de ovos. Dez amostras de parasitas adultos foram provenientes de um animal desparasitado com febendazol e cinco de um animal tratado com uma associação de febendazol e milbecina (tabela 3 em anexo) Foi realizada uma primeira identificação/seleção parasitária, pelas características fenotípicas, Hospedeiros Definitivos e também através da observação microscópica dos ovos.

4.3 – Caraterização filogenética

O conhecimento do Hospedeiro Definitivo permite uma maior sensibilidade na identificação da espécie, pela “especificidade de hospedeiro” existente, no que diz respeito a *Toxocara* spp. A baixa prevalência dos géneros *Toxascaris* ou mesmo de *Lagochilascaris* (não descrita sequer em Portugal) diminuem muito a probabilidade de

serem encontrados nestas amostras (14). No entanto a especificidade da identificação só foi possível após análise molecular.

Todas as 96 amostras foram amplificadas pela técnica PCR. Destas, 25, foram selecionadas para sequenciação, não sendo, no entanto possível a sua realização pela complexidade dos *primers*. Posteriormente repetiu-se a sequenciação para 14 amostras, correspondentes a 9 animais e por condicionantes várias, inerentes ao próprio trabalho experimental sequenciaram-se 6 amostras (2,4,62,45,35,51), 3 com 3 genes/subunidades de genes completos (amostras 2, 4 e 51).

Para a análise filogenética, procurou-se identificar pelo menos um dos genes (ITS, NAD, *COX1/COI*, 18S) nas formas parasitárias recolhidas, de cada um dos Hospedeiros Definitivos.

A sequenciação genética dos genes NAD, *COX I/COI* permitiu-nos concluir que o DNA proveniente das amostras números: 2 (ovos), 62 (adulto), 35 (adulto) e 45 (adulto) corresponde a *Toxocara cati* de acordo com as respetivas árvores genéticas.

A árvore genética seguinte corresponde à amostra número 2, gene NAD (representada na figura como amostra 1c).

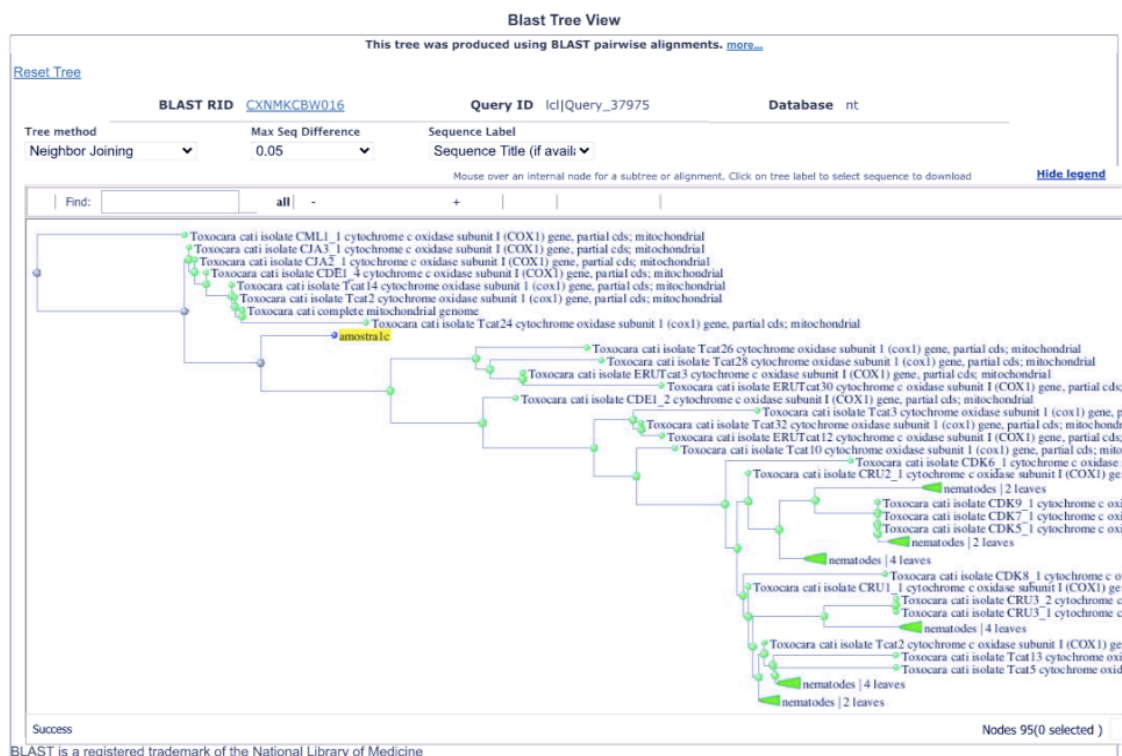


Fig 8 -Árvore genética amostra 2, gene NAD

Novamente a amostra número 2, mas agora relativamente ao gene COX, representada na árvore genética subsequente como 1 gene D, é também evidenciada a sua proximidade a *T.cati*.

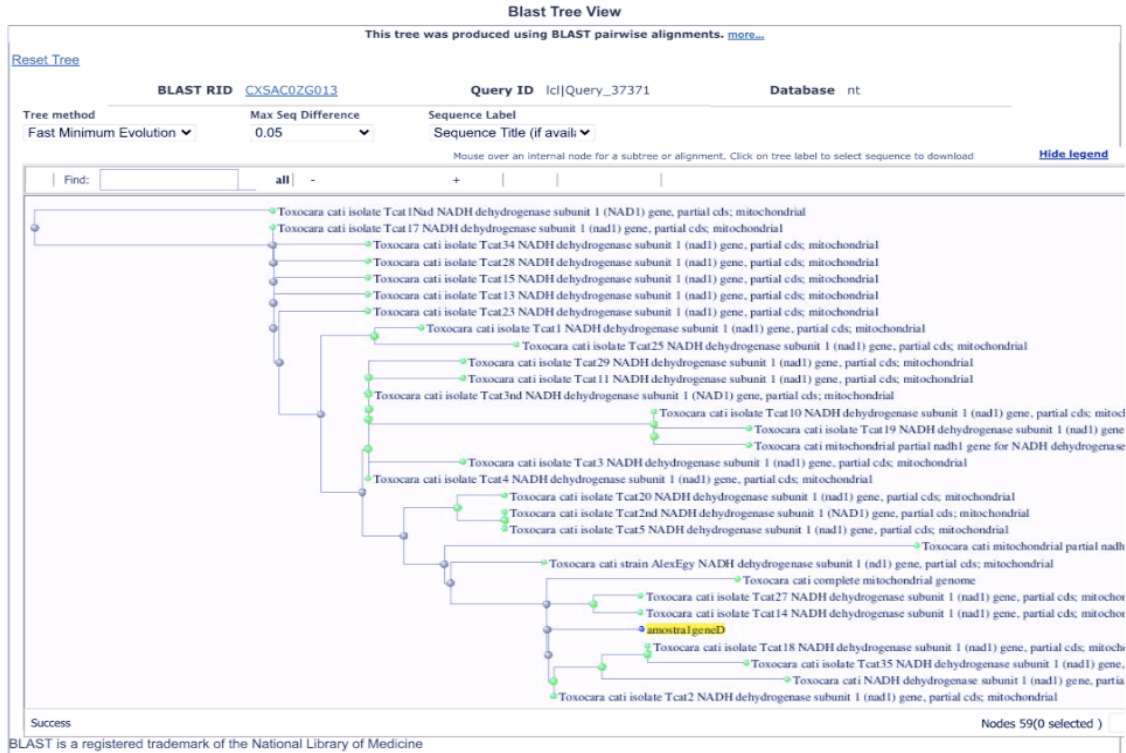


Fig 9 -Árvore genética amostra 2, gene COX

Na próxima árvore genética podemos ver a representação do gene COI, também da amostra 2.

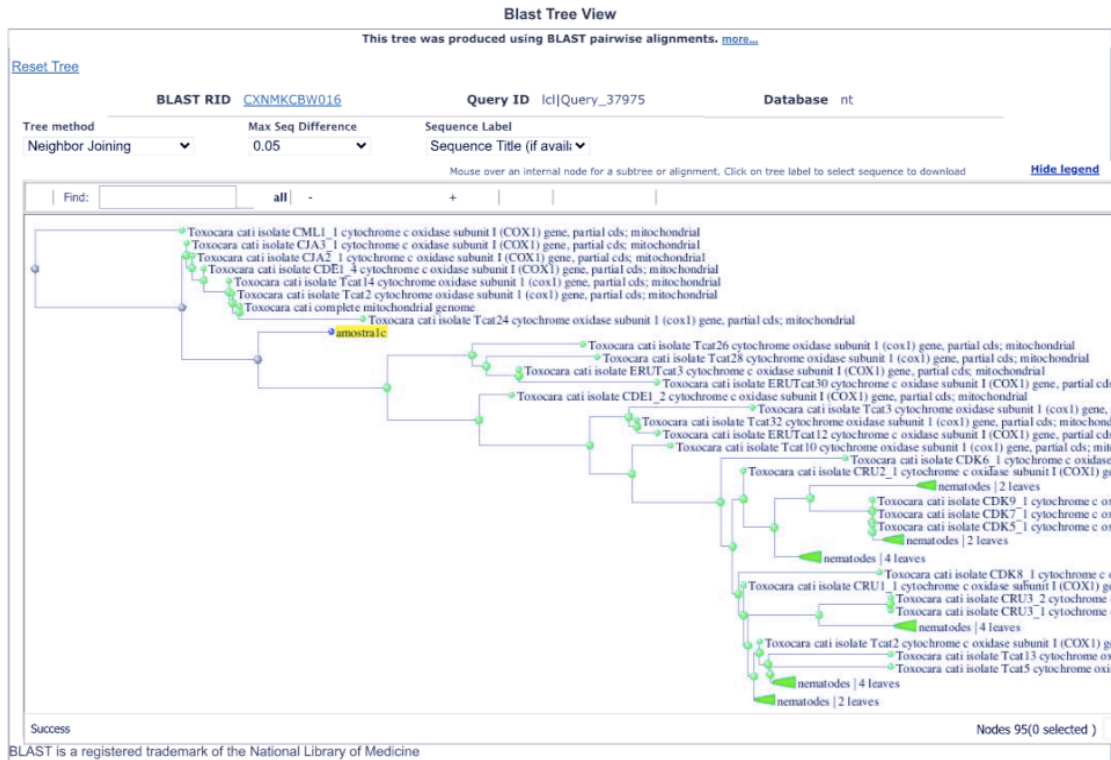


Fig 10 -Árvore genética amostra 2, gene COI

Passando para a amostra 62, na árvore adjacente, observa-se também a proximidade a *T. cati* quando da análise do gene COX (na árvore identificada como amostra 3 gene D)

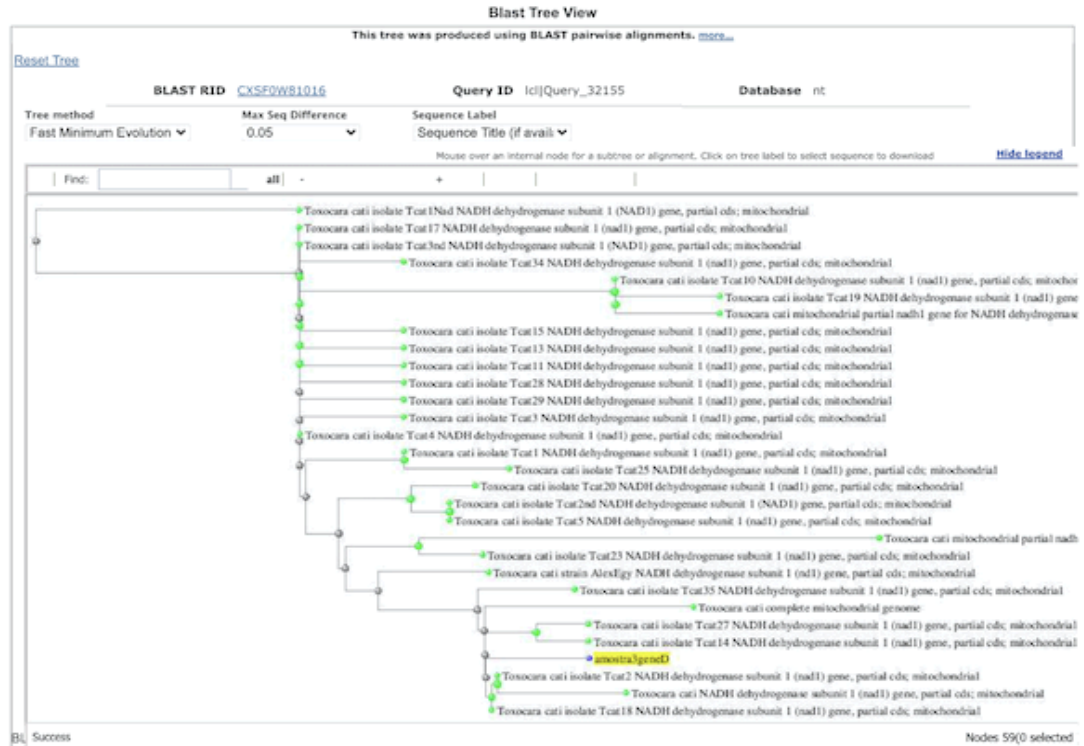


Fig 11 -Árvore genética amostra 62, gene COX

Ainda na amostra 62, gene COI, a árvore genética, representado como amostra 3 gene E.

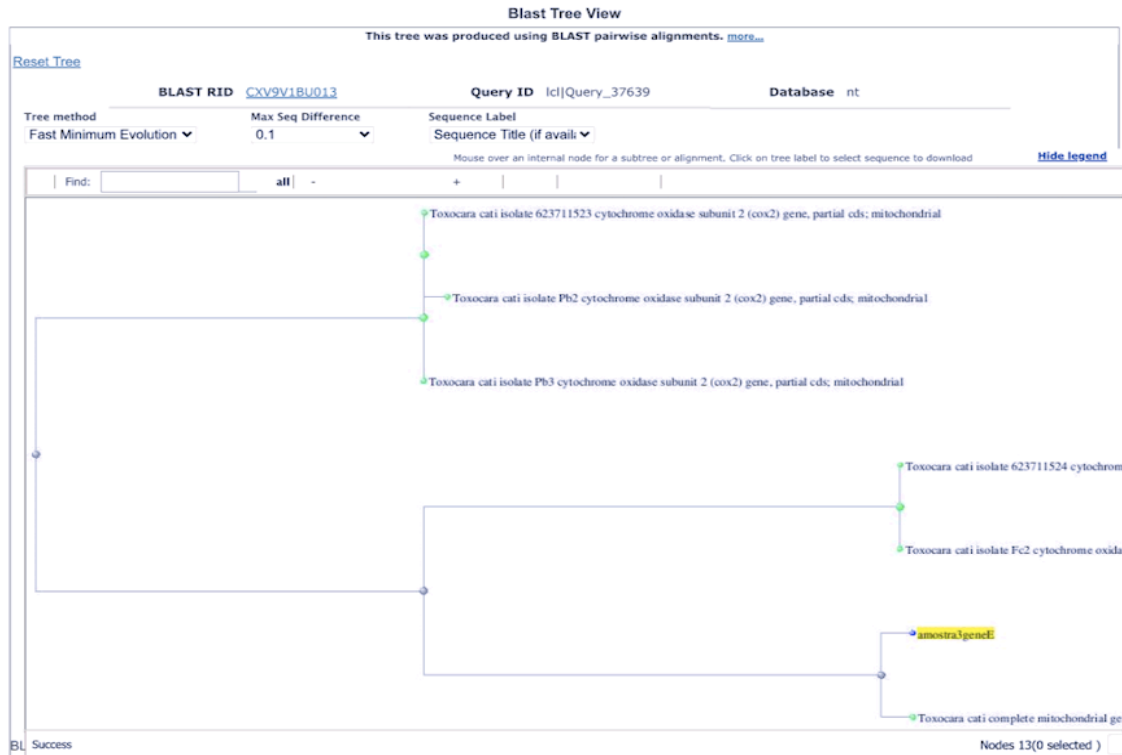


Fig 12 -Árvore genética amostra 62, gene COI

Passando para a amostra 35 gene COI, na a árvore genética como amostra 5 gene D.

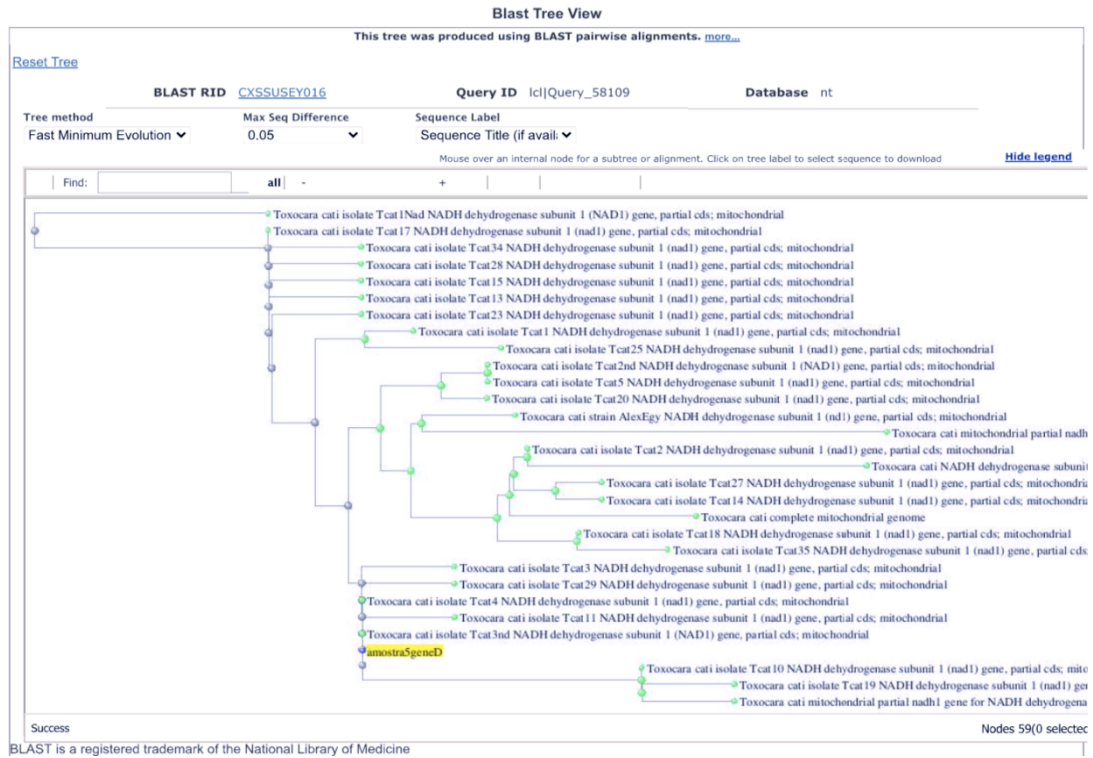


Fig 13 -Árvore genética amostra 35, gene COX

O gene COX da amostra 35, amostra 5 gene E.

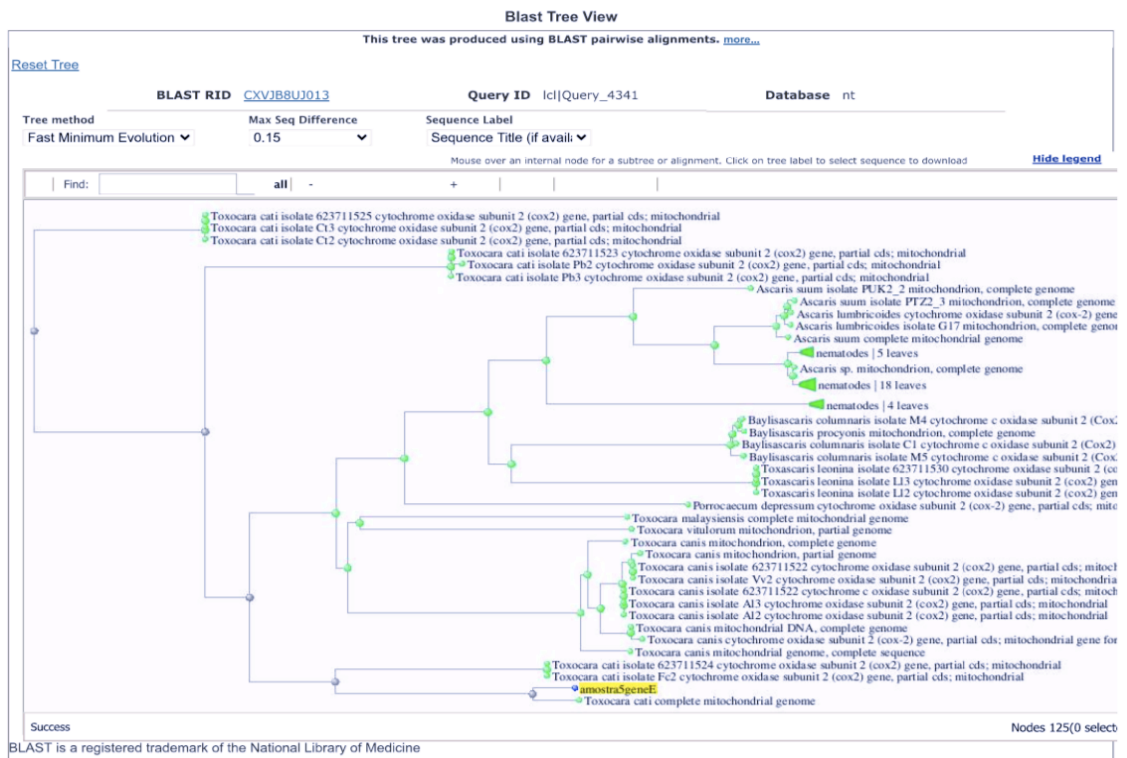


Fig 14 -Árvore genética amostra 35, gene COI

Na amostra 45, gene COX (na árvore respetiva como amostra 4 gene D) também voltamos a observar a maior proximidade a *T.cati*.

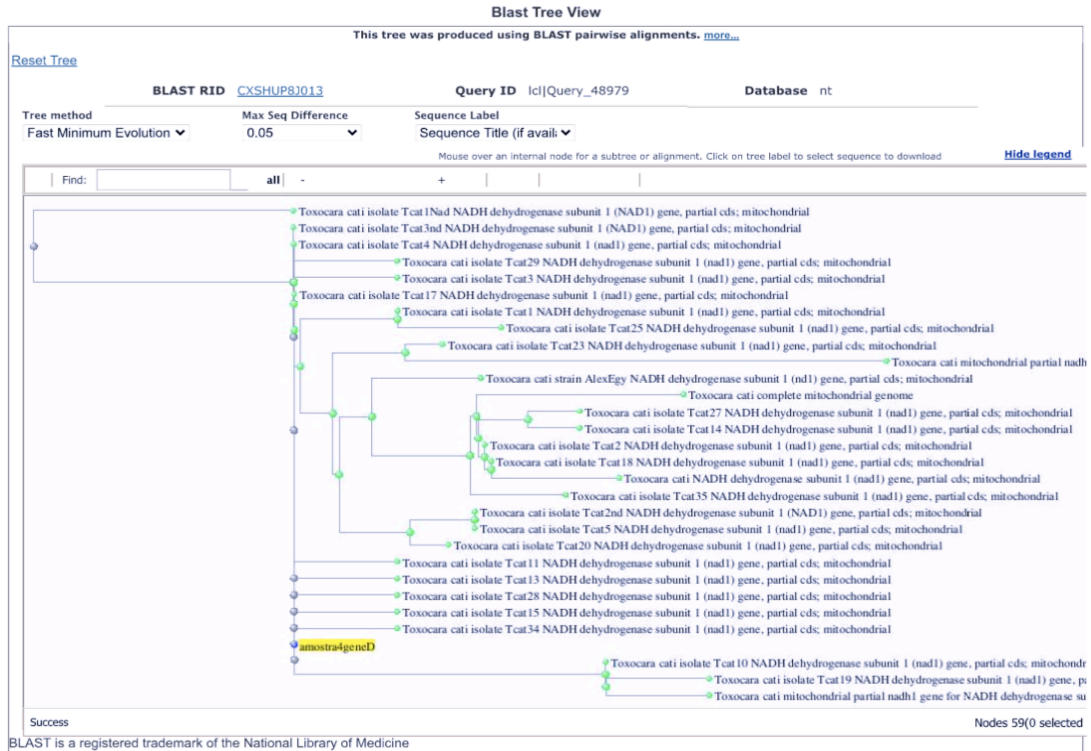


Fig 15 -Árvore genética amostra 45, gene COX

E tal como na árvore genética anterior, a proximidade a *T.cati* é mais uma vez evidente (amostra 4 gene E).

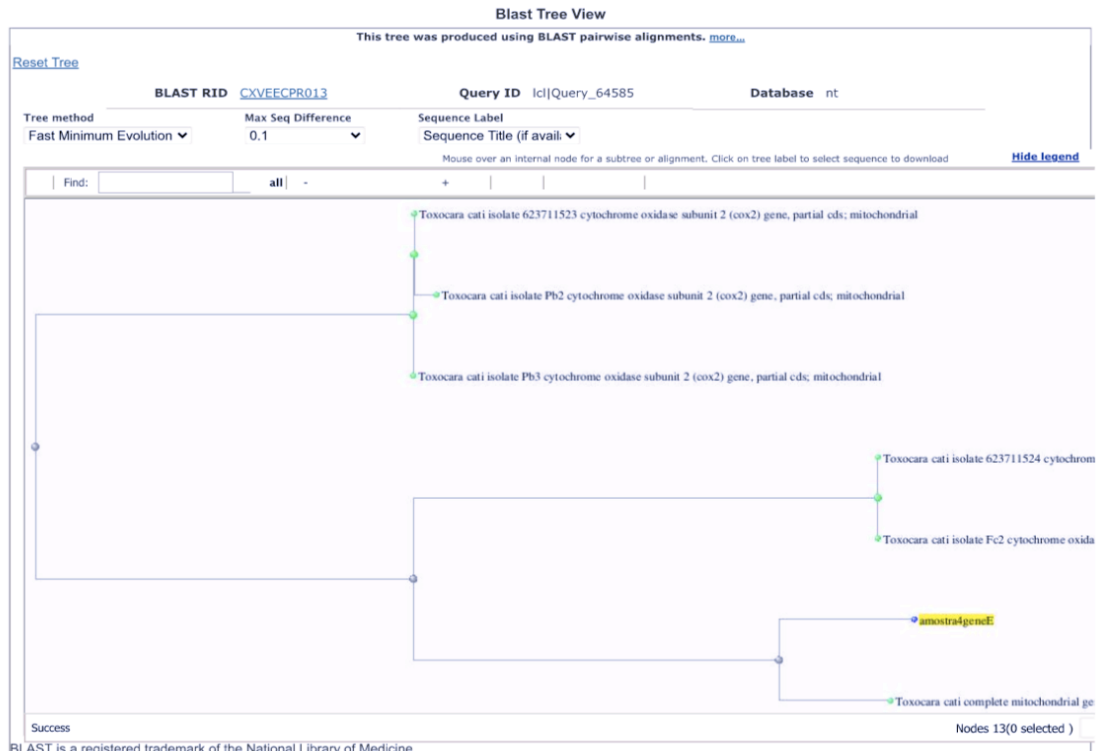


Fig 16 -Árvore genética amostra 45, gene COI

A sequência amplificada da amostra 51 (verme adulto) apresenta uma maior proximidade de *Toxocara canis*, para NAD, como observamos na árvore genética seguinte:

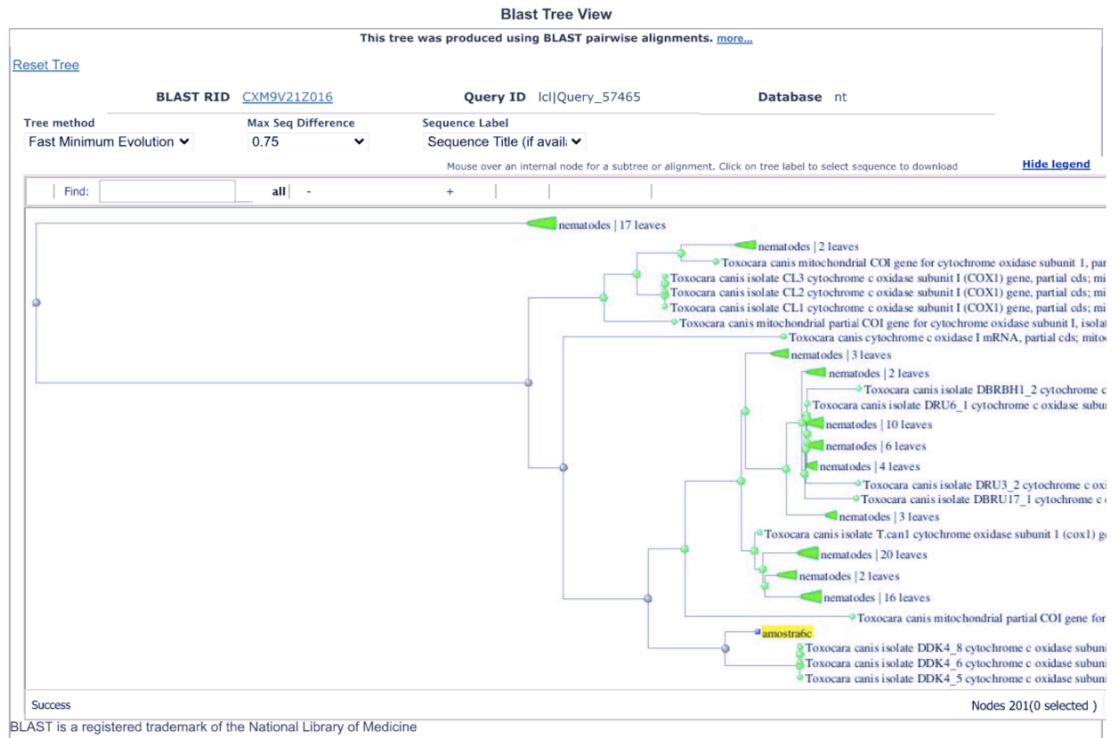


Fig 17 -Árvore genética amostra 51, gene NAD

A sequenciação da amostra 51 coloca-a mais próxima de *Toxocara cati* para COX I (amostra 6 gene D).

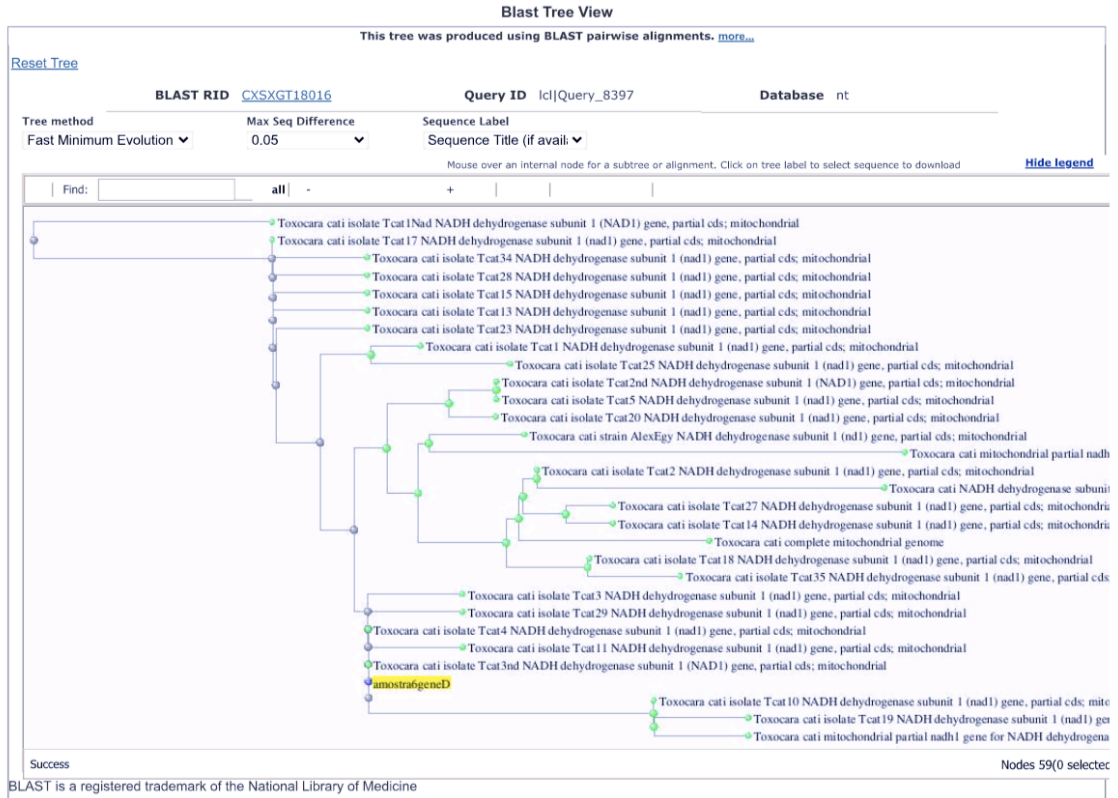


Fig 18 -Árvore genética amostra 51, gene COX

Existe alguma controvérsia na literatura existente no que diz respeito à infecção por *Toxocara* spp. em humanos. Alguns autores consideram que a maioria dos casos são da responsabilidade de *Toxocara canis* (62) enquanto que outros acreditam que a prevalência de *Toxocara cati* é subestimada, uma vez que os gatos têm acesso mais facilitado a zonas onde existe maior contato com crianças e por isso, têm maior responsabilidade nos casos de larva migrante visceral (63).

Existe também a possibilidade de diferentes animais selvagens, quer canídeos (como o caso da raposa, do chacal e do lobo) quer felídeos (como o lince) estarem na origem da infecção, como Hospedeiros definitivos de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (48). A infecção patente nestes animais, associada a completa ausência de tratamento, poderá ser determinante na existência de de ovos de *Toxocara* spp. no ambiente. Análises filogenéticas serão determinantes para clarificar o papel destes carnívoros na contaminação de ambientes urbanos, através do seu movimento pelas fronteiras das cidades e o seu potencial para infetar gatos e cães de rua.

Estudos epidemiológicos auxiliados pela biologia molecular são necessários para esclarecer esta dúvida.

Numa mostra de ovos foi identificada uma infecção mista (*Toxocara cati* e *Aerulostrongylus* sp.).

Alterações na sequenciação

As tabelas 5, 6 e 7 mostram a percentagem de identidade dos genes das amostras analisadas, permitindo-nos encontrar as semelhanças vs diferenças entre as respetivas bases.

Gene NAD

Amostra	Amostra 4	Amostra 2	Amostra51
Amostra 4	100.00	83.52	86.07
Amostra 2	83.52	100.00	87.33
Amostra 51	86.07	87.33	100.00

Tabela 5 Identidade do gene nad para as amostras 4,2 e 51

Gene subunidade COX

NºAmostra	4	2	62	45	35	51
4	100.00	97.30	99.16	98.33	98.38	98.37
2	97.30	100.00	100.00	99.16	97.30	97.29
62	99.16	100.00	100.00	99.17	99.16	99.16
45	98.33	99.16	99.17	100.00	100.00	100.00
35	98.37	97.29	99.16	100.00	100.00	100.00
51	98.37	97.29	99.16	100.00	100.00	100.00

Tabela 6 Identidade do gene/subunidade COX para as amostras 4, 2, 62, 45, 35 e 51

Gene subunidade COI

NºAmostra	4	35	45	2	62	51
4	100.00	100	98.87	98.39	97.16	90.48
35	100.00	100.00	98.87	98.39	98.39	90.48
45	98.87	98.87	100.00	98.57	96.84	89.52
2	98.39	98.39	98.57	100.00	98.42	89.52
62	98.39	98.39	96.84	98.42	100.00	88.89
51	90.48	90.48	89.52	89.52	88.89	100.00

Tabela 7 Identidade do gene COX/subunidade para as amostras 4,35,45,2,62 e 51

Relativamente às amostras em questão, a diversidade mais notória encontra-se no gene NAD, onde a percentagem de identidade entre os genes não ultrapassa os 87.33%, encontrando -se este valor máximo de identidade por comparação entre a amostra 2 e a amostra 51. A diferença chega ao valor de 16,48% entre as amostras 2 e 4.

Quando comparamos a subunidade COX entre as amostras podemos observar percentagens maiores de identidade. Neste caso, as amostras 2 e 62 são idênticas entre si, bem como as amostras 35, 45 e 51, no que diz respeito à subunidade COX1, o que significa que não sofreram quaisquer mutações.

Já a subunidade COI é semelhante (100%) nas amostras 4 e 35.

A figura 20 mostra as mutações na sequência do gene NAD, relativamente às amostras analisadas:

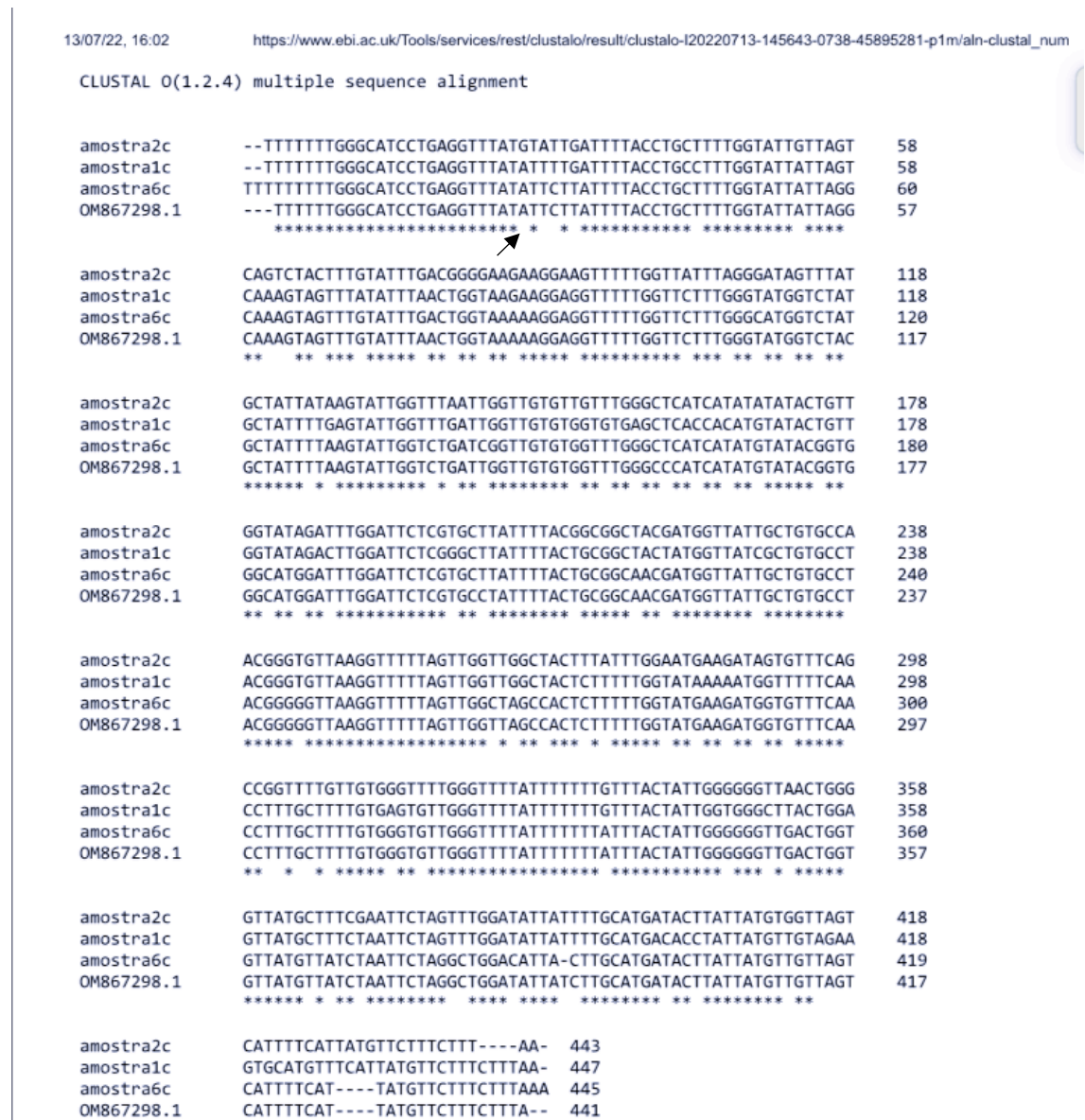


Fig 20 sequência gene NAD para as amostras 4, 2 e 51 (que correspondem na figura aos números 2, 1 e 6 respetivamente)

Na posição 26 encontramos a primeira alteração identificada com a seta a negro: encontramos uma guanina na amostra 4 e uma adenina nas amostras 2 e 51. As restantes alterações ao longo da sequência estão identificadas com a ausência do asterisco (*)

As figuras 21 e 22 representam as seqüências das subunidades COX e COI, com as mutações das bases identificadas também com a ausência de asterisco (*).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

amostra2geneD      -TTTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  59
amostra1geneD      -TTTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  59
amostra3geneD      TTTTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  60
amostra4geneD      TTTTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  60
amostra5geneD      -TTTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  59
amostra6geneD      --TTCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  58
MW129965.1         ---TCTTATGAGATTGCTTTTTCTTTGTATTTGTTGGTGGTTATTATTCATGTTAACATG  57
*****

amostra2geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  119
amostra1geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  119
amostra3geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  120
amostra4geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  120
amostra5geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  119
amostra6geneD      TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  118
MW129965.1         TTTTGTTTTCTCCGGTTTTAAATTTGAGTTTGTGGTGAATTTATTTGCCATTTTATTT  117
*****

amostra2geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAGCTT  179
amostra1geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAGCTT  179
amostra3geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAGCTT  180
amostra4geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAACTT  180
amostra5geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAACTT  179
amostra6geneD      ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAACTT  178
MW129965.1         ATGGTTTTAGCTGAGTTGAATCGTGCTCCTTTTGATTTTGTGAAGGAGAGAGTGAACTT  177
*****

amostra2geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  239
amostra1geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  239
amostra3geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  240
amostra4geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  240
amostra5geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  239
amostra6geneD      GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  238
MW129965.1         GTTAGAGGTTATAATGTTGAATATTCTAGAGTGGCTTTTGTTTTGTTGTTCTTGGGGGAA  237
*****

amostra2geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAATTTT  299
amostra1geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  299
amostra3geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  300
amostra4geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  300
amostra5geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  299
amostra6geneD      TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  298
MW129965.1         TACGGGGCTTTGTTGTTTTTAGTACTTTAACTTCTGTGTTATTTTGGTTTTAGTTTT  297
*****

amostra2geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  359
amostra1geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  359
amostra3geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  360
amostra4geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  360
amostra5geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  359
amostra6geneD      TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  358
MW129965.1         TTGGTTATTTATCTTATGTTTACTTTGTTAGTTTTATCCGTAATGCTTACCCTCGTTTT  357
*****

amostra2geneD      CGTTATGATAA- 370
amostra1geneD      CGATTATGATAA 371
amostra3geneD      ----- 360
amostra4geneD      ----- 360
amostra5geneD      CGTTATGATAAA 371
amostra6geneD      CGTTATGATAA- 369
MW129965.1         CGTTATGAT--- 366

```

Fig 21 seqüência COX para as amostras 4, 2, 62, 45, 35 e 51 (que correspondem na figura aos números 2, 1, 3, 4, 5 e 6 respetivamente)

```

amostra1geneE      TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAAGTAGGTGAACCGCGTCTG 368
amostra3geneE      TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAAGTAGGTGAACCGCGTCTG 369
*****

amostra6geneD      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 427
AM411622.1        TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 8348
amostra2geneE      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 427
amostra5geneE      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 427
amostra4geneE      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 428
amostra1geneE      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 428
amostra3geneE      TTGGAAGTGGATAATCGTTGTGTGTTGTACCTTGTGATACTAATATTCGGTTTTGTATTACT 429
*****

amostra6geneD      TCTGGGGATGTGATTCATTCTTGGGCTTTACCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 487
AM411622.1        TCTGGAGACGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 8488
amostra2geneE      TCTGGAGATGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 487
amostra5geneE      TCTGGAGATGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 487
amostra4geneE      TCTGGAGATGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 488
amostra1geneE      TCTGGAGATGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 488
amostra3geneE      TCTGGAGATGTAATCCACTCTTGGGCTTTGCCCTAGTATGGCTATTAAGTTGGATGCTATG 489
*****

amostra6geneD      AGTGGTATTTTGACCACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGGCAG 547
AM411622.1        AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 8488
amostra2geneE      AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 547
amostra5geneE      AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 547
amostra4geneE      AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 548
amostra1geneE      AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 548
amostra3geneE      AGAGGTATTTTGACTACTTTGTCTTATAGTTTTCTGTAGTAGGTGTTTTTATGGTCAA 549
**

amostra6geneD      TGTTCGAGATTTGTGGTGCTAATCATAGTTTTATGCCTATTGTTTTGGAGGTTACTTTG 607
AM411622.1        TGTTCGAAATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 8528
amostra2geneE      TGTTCGAAATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 607
amostra5geneE      TGTTCGAAATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 607
amostra4geneE      TGTTCGATATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 608
amostra1geneE      TGTTCGAAATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 608
amostra3geneE      TGTTCGAAATCTGTGGTGCTAACCACAGTTTCATGCCTATTGTTTTAGAGGTTACTTTG 609
*****

amostra6geneD      TTGGATAATTTTAAAGTTGGTG----- 630
AM411622.1        TTGGATAATTTTAAAGGCTGATGTTTGGGTTTATGGATGATAGTGTATGATTAAGCT 8588
amostra2geneE      TTGGATAATTTT----- 628
amostra5geneE      TTGGATAATTTT----- 628
amostra4geneE      TTGGATAATTTTAGAAGTTGGTG----- 633
amostra1geneE      TTGGATAATTTTAGAAGTTGGTG----- 631
amostra3geneE      TTGGATAATTTTAAAAAGTTGGTG----- 633
*****

```

```

amostra6geneD      AGNTATATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGGCTTTTGTGGGGTTTTGTCTTT 67
AM411622.1        AGTTATATGGATTGATTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGAGTTTTGTCTTT 7980
amostra2geneE      AGTTATATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGGGTTTTGTCTTT 67
amostra5geneE      AGTTATATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGGGTTTTGTCTTT 67
amostra4geneE      GGGTTTATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGGGTTTTGTCTTT 68
amostra1geneE      GGTATATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGAGTTTTGTCTTT 68
amostra3geneE      GGTATATAGATTGGTTTCATAATTTAATTGTAGTCTTTTATTTGGAGTTTTGTCTTT 69
* * * * *

amostra6geneD      GTGTCGACTAGGTTTGTATTATTGTTGTTGAGTAAATTTATTTTAAAAGTAAGAAGATT 127
AM411622.1        GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGTAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 8040
amostra2geneE      GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGCAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 127
amostra5geneE      GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGCAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 127
amostra4geneE      GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGCAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 128
amostra1geneE      GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGTAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 128
amostra3geneE      GTGTCGACCAGTTTTGTGATTTGTTGTTGAGTAAGTTTTATTTTAAAAGTAAAAAATC 129
***** ** *****

amostra6geneD      GAGTACCAGTTTGGTGAGTTGTTGTGTAGTGTTTTCTACTTTGATTTTGGTGATACAG 187
AM411622.1        GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 8100
amostra2geneE      GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 187
amostra5geneE      GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 187
amostra4geneE      GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 188
amostra1geneE      GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 188
amostra3geneE      GAGTATCAGTTTGGGGAGTTGTTGTGTAGTGTATTTCTACTTTGATTTTGGTAATACAA 189
***** *****

amostra6geneD      ATGGTGCCCTTCCTTGAGTTTGCCTTATTATTATGGTTTAAATAAATTTGGATAGTAACTTG 247
AM411622.1        ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 8160
amostra2geneE      ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 247
amostra5geneE      ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 247
amostra4geneE      ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 248
amostra1geneE      ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 248
amostra3geneE      ATGGTACCTTCTTTGAGTTTATTGTATTATTATGGTTTAAATGAATTTAGATAGGAATTTG 249
***** *****

amostra6geneD      ACTGTTAAGGTTACGGGTCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAGTTTGTAGTACATCCCGGT 307
AM411622.1        ACTGTTAAGGTTACGGGCCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCAGGA 8220
amostra2geneE      ACTGTTAAGGTTACGGGTCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCCTGGA 307
amostra5geneE      ACTGTTAAGGTTACGGGTCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCCTGGA 307
amostra4geneE      ACTGTTAAGGTTACGGGTCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCCTGGA 308
amostra1geneE      ACTGTTAAGGTTACGGGCCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCAGGA 308
amostra3geneE      ACTGTTAAGGTTACGGGCCATCAGTGGTATTGAAGTTATGAATTTAGTGATATCCAGGA 309
***** *****

amostra6geneD      TTGGAGTTTGATTCTTATATAAAATCTTTGGATCAGTTGGAATTGGGGGAACCTCGTTTG 367
AM411622.1        TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAACTAGGTGAACCGCGTCTG 8280
amostra2geneE      TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAACTAGGTGAACCGCGTCTG 367
amostra5geneE      TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAACTAGGTGAACCGCGTCTG 367
amostra4geneE      TTGGAATTTGATTCTTATATGAAGTCTTTGGATCAGTTAGAACTAGGTGAACCGCGTCTG 368

```

https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/rest/clustalo/result/clustalo-I20220713-165214-0624-87096605-p1m/aln-clustal_num

Fig 22 Sequência COX para as amostras 4, 35, 45, 2 e 62 (que correspondem na figura aos números 2, 5, 4, 1 e 3 respectivamente)

A NADH desidrogenase catalisa o transporte eletrônico do NADH para a Coenzima Q10 (fundamental para a produção de energia nas mitocôndrias das células). A citocromo C oxidase está envolvida no processo de produção de ATP.

Ambas as enzimas, codificadas pelos genes respectivos analisados, estão diretamente envolvidas no processo de obtenção de energia das células, que poderá sofrer alterações resultantes da ocorrência de mutações ao longo de várias gerações.

Para mutações identificadas nestes genes encontramos vários exemplos de resistência a fármacos, como no caso a isoniazida no combate a *Mycobacterium smegmatis*, em que um defeito na NADH desidrogenase condiciona a eficácia do medicamento.

O fato de encontrarmos divergências na sequência genômica leva-nos a assumir a probabilidade de outras mutações ocorrerem noutros genes, diretamente implicados no mecanismo de resistência aos benzimidazóis.

5. Conclusões

5. Conclusões

A identificação molecular de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* foi realizada com sucesso em todas as amostras possíveis de sequenciação. Foi confirmada a identidade dos parasitas estudados. Numa mostra de ovos foi identificada uma infecção mista (*Aerulostrongylus* sp.).

Os resultados encontrados revelam uma evidente heterogeneidade genética dos parasitas.

A pressão do fármaco na população parasitária está diretamente associada ao desenvolvimento de resistências. Este parece ser um fenómeno hereditário, em que o gene ou genes responsáveis, se encontram previamente presentes na população de parasitas. Sendo considerado um fenómeno pré adaptativo, a resistência ocorre mesmo antes da utilização de qualquer antiparasitário, resultando de um processo de seleção.

Em determinadas condições, após a exposição a um anti-helmíntico, os helmintas que transportam os genes responsáveis pela resistência são os que irão sobreviver à ação do fármaco. Ao reproduzirem-se, estes parasitas vão consequentemente aumentando o conjunto de genes que conferem resistência numa população.

As alterações no alinhamento das bases na sequência dos genes analisados resultantes de mutações ao longo de gerações, que indicam uma maior probabilidade de resistências a fármacos.

Os genes mitocondriais apresentam uma probabilidade de mutação reduzida, pelo que a sua existência nestes parasitas revela que podemos estar perante uma pressão de fármaco algures nos seus ascendentes.

A emergência da resistência aos anti-helmínticos e, especificamente aos compostos benzimidazólicos, constitui um problema de maior importância, considerando a limitação de antiparasitários disponíveis para o tratamento e controlo destas parasitoses, nos animais de companhia e na infecção humana, medida integrada numa abordagem One Health

6. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- 1-Fakhri Y, Gasser RB, Rostami A, Fan CK, Ghasemi SM, Javanian M, Bayani M, Armoon B, Moradi B. Toxocara eggs in public places worldwide - A systematic review and meta-analysis. *Environ Pollution*. 2018 Nov;242(Pt B): 1467-1475.
- 2-Rostami Ali, Riahi Seyed, Holland Celia, Taghipour Ali, Khalili-Fomeshi Mohsen, Fakhri Yadolah, Omrani Vahid, Hotez Peter, Gasser Robin. Seroprevalence estimates for toxocariasis in people worldwide: A systematic review and meta-analyses. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2019 Dez; 13 (12).
- 3- Auer, H; Walochnik, J.Chapter Six - Toxocariasis and the clinical spectrum in Bowman D, editor. *Advances in Parasitology*. Elsevier. 2021; 109: 111-130.
- 4-Lötsch, Felix; Vingerling, Rieke; Spijker, Rene; Grobusch, Martin. Toxocariasis in humans in Africa – a systematic review. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2017.
- 5- Alho, Ana Margarida; Ferreira, Pedro Manuel; Clemente, Isabel; Grácio, Maria Amélia; Belo, Silvana. Human Toxocariasis in Portugal-An Overview of a Neglected Zoonosis over the Last Decade (2010-2020). *Infectious Diseases Report*. 2021, 13, 938-948. Disponível em <http://doi.org/10.3390/idr13040086>.
- 6- Guangxu, Ma; Rostami, Ali; Wang, Tao. Global and regional seroprevalence estimates for human toxocariasis: a call of action. *Advance parasitology*. Elsevier Ltd. 2020; 109 (14):275-290.
- 7-Fragoso, Roberta; Monteiro, Mariza; Lemos, Elenice; Pereira, Fausto. Anti-Toxocara antibodies detected in children attending elementary school in Vitoria, State of Espírito Santo, Brazil: prevalence and associated factors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011;44(4): 461-466.
- 8-Pureza, David. Prevalência, grau de contaminação e viabilidade de ovos de *Toxocara* spp. em parques públicos da área da grande Lisboa [dissertação de mestrado]. [Lisboa]: Faculdade de Medicina Veterinária. 2015. 128p.
- 9-Despommier, Dickson. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003 Apr;16: 265-272.
- 10-Castelo, Teresa; Dinis, Alexandra; Rocha, Graça. Toxocarose. Protocolo de actuação. *Ata Pediátrica Portuguesa*. 2008;39(4): 171-5.

- 11-Otero, David; Alho, Ana; Nijse, Rolf; Roelfsema, Jeroen; Overgaauw, Paul; Madeira de Carvalho, Luís. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*. 2018;11: 94–98.
- 12-Overgaauw, Paul; Knapen, Frans. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*. 2013(4);193: 398–403.
- 13-Bedford, Emma; Global dog and cat pet population 2018: Number of dogs and cats kept as pets worldwide in 2018 [internet]; 2020 Mar 10. Disponível em <https://www.statista.com/statistics/1044386/dog-and-cat-pet-population-worldwide/>
- 14-Bau, Alberto Viadel. Atlas clínico de los parásitos gastrointestinales del perro e el gato. Urano Vet. 2014.
- 15-Fava, Natália Relações filogenéticas de *Toxocara* spp. e *Toxascaris* sp. provenientes de diferentes regiões do mundo [tese de doutoramento]. [Uberlândia]: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. 2017. 114p.
- 16-Araujo, Paulo. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1972;14(2): 83-90.
- 17-Kotze, A. C.; Hunt, P. W; Skuce, P; von Samson-Himmelstjerna, G; Martin, R. J; Sager H; Krücken, J et al. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*. 2014; 4(3): 164–184.
- 18-Overgaauw, Paul. *Critical Reviews in Microbiology*. 1997;23: 233-51.
- 19-Souza, Antonio Pereira de et al. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural* [internet]. 2008; 38(5):1363-1367. Disponível em <https://www.scielo.br/j/cr/a/ZdBZQMdQqL4MkyL3PjpzPqQ/abstract/?lang=pt>
- 20-Nijse, R; Mughini-Gras, L; Wagenaar, JA; Ploeger HW; Coprophagy in dogs interferes in the diagnosis of parasitic infections by faecal examination. *Veterinary Parasitology*. 2014; (3-4): 304-309.

- 21-Sprent, JFA Observations on the systematics of ascaridoid nematodes in Stone, AR; Platt, HM; Khalil, LF, Editors. *Concepts in nematode systematics. - Systematics Association*. London: Academic Press; 1983; 22: 303-319.
- 22-Beech RN, Skuce P, Bartley DJ, Martin RJ, Prichard RK, Gilleard JS. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology*. 2011;138(2):160-174.
- 23-Gibbons, LM, Jacobs, DE, Sani, RA. *Toxocara malaysiensis* n. sp. (Nematoda: Ascaridoidea) from domestic cat (*Felis catus* L.). *Journal of Parasitology*; 2001. 87:660-665.
- 24-Gasser, Robin; A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. *Veterinary Parasitology*. 2013; 193(4): 353-364
- 25-Xie Y, Li Y, Gu X, Liu Y, Zhou X, Wang L, et al. Molecular characterization of ascaridoid parasites from captive wild carnivores in China using ribosomal and mitochondrial sequences. *Parasites and Vectors*. 2020 Jul 29;13(1).
- 26-Yang CH, Wu KC, Chuang LY, Chang HW. Decision Theory-Based COI-SNP Tagging Approach for 126 Scombriformes Species Tagging. *Frontiers in Genetics* 2019 Apr 3;10:259.
- 27-Willian, Roldan; Rubinsky-Elephant, Guita, Immunodiagnosis of human Toxocariasis. *Serological Diagnosis of Certain Human, Animal and Plant Diseases*. 2012: 97-112.
- 28-Chen et al. *Infectious Diseases of Poverty*. 2018; 7:59.
- 29-Auer, H; Walochnik, J. Toxocariasis and the clinical spectrum. *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. 2020; 109 (5): 111-130.
- 30-Carvalho EA, Rocha RL. Toxocariasis: visceral *larva migrans* in children; *Jornal de Pediatria*. 2011;87(2).
- 31-Baneth, G; Thamsborg, S; Otranto,D; Guillot, J; Blaga, R; Deplazes, P et al. Major Parasitic Zoonoses Associated with Dogs and Cats in Europe. *Journal of Comparative Pathology*. 2016;155 (1-1): S54-S74.
- 32-Nicoletti, Alessandra. Neurotoxocariasis. *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. 2020; 109 (11): 219-231.
- 33- Mazur-Melewska, Katarzyna; Mania, Anna; Sluzewski, Wojciech; Figlerowicz Magdalena. *Clinical Pathology of larval toxocariasis*. Elsevier Ltd. 2020; 109 (8): 153-163.

- 34-Neumayr, Andreas. Antiparasitic Treatment Recommendations - *A practical guide to clinical parasitology*. Hamburgo: Tredition GmbH; 2016. 190p.
- 35-Kamanna, Kantharaju. Synthesis and Pharmacological Profile of Benzimidazoles [internet]. intechOpen 2019 Out 2.
- 36-Matos, Mariana; Hábitos de desparasitação em animais de companhia: inquérito a proprietários de cães e gatos, da região de Lisboa, Portugal; Lisboa [dissertação de mestrado]. [Lisboa]: Faculdade de Medicina Veterinária. 2013.
- 37-Stull JW; Carr AP; Chomel BB; Berghaus RD; Hird DW. Small animal deworming protocols, client education, and veterinarian perception of zoonotic parasites in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 2007;48(3): 269-276.
- 38-Orenzini, Gustavo;Tasca, Tiana; Attilio, Geraldo; Carli, De. Prevalence of intestinal parasites in dogs and cats under veterinary care in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*. 2007;44: 137-145.
- 39-Trasviña-Muñoz, Enrique; López-Valencia, Gilberto; Centeno, Pedro Álvarez; Cueto-González, Sergio; Monge-Navarro, Francisco; Tinoco-Gracia, Luis set al. Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico. *Austral journal of veterinary sciences*. 2017; 49(2): 105-111.
- 40-Pereira et al. Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices *Parasites & Vectors*. 2016; 9:245.
- 41-Szwabe, K; Blaszkowska, J. Stray dogs and cats as potential sources of soil contamination with zoonotic parasites. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24(1): 39-43.
- 42-Malcata F. Prevalência e controlo dos parasitas gastrointestinais em explorações bovinas leiteiras em Portugal continental. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2014.
- 43-Junquera, P. Parasitipedia: Benzimidazoles for veterinary use as antihelmintics in cattle, sheep, goats, pig, poultry, horses, dogs and cats against parasitic [internet]. 2021, Jul 9. Disponível em https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2440:benzimidazoles-eng&catid=212&tmpl=component&print=1&layout=default&Itemid=2701
- 44-Maddison, J; Page, S; Church,D, editors. *Small Animal Clinical Pharmacology*. 2th ed. Hertfortshire: Saunders Elsevier Limited; 2008. 600 p.

- 45-Abongwa, M; Martin, R J; Robertson, A P. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta veterinaria*. 2017;67(2): 137–152.
- 46-Dilks, C; Hahnel, Sheng,Q; Long, L; McGrath, P; Andersen, E. Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta-tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020; 14: 28–36.
- 47-Silvestre, Anne; Cabaret, Jacques. Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Molecular and biochemical parasitology*. 2002; 120:297-300.
- 48-Furtado, Luis; Medeiros, Celi; Zuccherato, Luciana; Alves, William; Oliveira, Valéria; Silva, Vivian First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta- tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. PLoS One. 2019 Oct 17;14(10).
- 49- Carlin, Ellen; Tyungu, Dora. Toxocara: Protecting pets and improving the lives of people. *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd. 2020; 109 (1): 1-16.
- 50-Edward T. Ryan, Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases, in Sarah S. Long, Charles G. Prober, Marc Fischer. Antiparasitic Agents [internet] 5th ed Elsevier; 2018. p. 1567-1587. Disponível em (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323401814002966>)
- 51-McCarthy, JS; Moore, TA. *Drugs for Helminths: Principles and Practice of Infectious Diseases*. 8th ed. W.B. Saunders; 2015. p. 519-527.
- 52-Willis, HHA. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal Australia*. 1921;8: 375-376.
- 53-Cringoli, G. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parasitologia*. 2006, Sep;48(3): 381-4.
- 54-Oliveira, Márcia; Regitano, Luciana; Roese, Alexandre. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Paulo: Embrapa; 2007. 43p.
- 55-Sepahvand, A; Pestehchian, N; Yousefi, HA; Gharehbaba, RP. Comparison and evaluation of four methods for extracting DNA from *Giardia duodenalis* cysts for PCR targeting the *tpi* gene. *Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology*. 2017;41(1): 263–267.

- 56-Doyle, Stephen; Sankaranarayanan, Geetha; Allan, Fiona; Berger, Duncan; Castro, Pablo; Collins, James et al. Evaluation of DNA Extraction Methods on Individual Helminth Egg and Larval Stages for Whole-Genome Sequencing. *Frontiers in Genetics*. 2019;10: 286.
- 57-Chauhan, Tusher. Genetic Education: CTAB DNA extraction buffer for plant DNA extraction[internet]; 2019 Fev 17. Disponível em <https://geneticeducation.co.in/ctab-dna-extraction-buffer-for-plant-dna-extraction/>
- 58-Page, AP; Johnstone, IL. Wormbook: The cuticle [internet]. The *C.elegans* Research Community; 2007 Mar 19. Disponível em http://www.wormbook.org/chapters/www_cuticle/cuticle.html
- 59- El-Seify, M. A., Marey, N. M., Satour, N., Elhawary, N. M., & Sultan, K. (2021). Prevalence and Molecular Characterization of *Toxocara cati* Infection in Feral Cats in Alexandria City, Northern Egypt. *Iranian journal of parasitology*, 16(2), 270–278. <https://doi.org/10.18502/ijpa.v16i2.6319>
- 60- Mahdy, O. A., Mousa, W. M., Abdel-Maogood, S. Z., Nader, S. M., & Abdel-Radi, S. (2020). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of *Toxocara* Species in Dogs, Cattle and Buffalo in Egypt. *Helminthologia*, 57(2):83–90. <https://doi.org/10.2478/helm-2020-0013>
- 61- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2016. *Veterinary Parasitology*. 4ª Edição. Chichester (GB): Wiley Blackwell.
- 62- Moreira GM, Telmo Pde L, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ et al. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol*. 2014;30(9):456-64. doi: 10.1016/j.pt.2014.07.003.
- 63- Beugnet F, Halos L, Guillot J. Textbook of Clinical Parasitology in Dogs and Cats. Zaragoza, Spain: *Servet Publishing*; 2018
- 64-Avramenko, RW; Redman, EM; Melville, L; Bartley, Y; Wit, J; Queiroz, C; Bartley, DJ; Gilleard, JS. Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. *International Journal of Parasitology*. 2019 Jan;49(1) :13-26.

7. Anexos

7. Anexos

AMOSTRAS PROVENIENTES DE TODOS OS ANIMAIS INTERVENIENTES ESTUDO

Animal	Amostras para sequenciar	Nome-Gênero	Idade	Ambiente	Desparasitação	Caracterização
1	54	?X(ASP) F	Adulto	casa	Não (sem desp. regulares)	De casa mas com acesso à rua (data colheita - dc 18/7/2020)
2	8,63,64,65,66	?Y(ASP)F	Adulto	Casa	Não (sem desp. Regulares)	De casa, mas com acesso à rua (dc18/7/20)
3	89	?X(ARM)F	«3 meses	Abrigo Rio Maior	Não	dc7/8/2020
4	5,90,91,92	?Y(ARM)F	>6 meses	Abrigo Rio Maior	Pirantel	Após desparasitação, sem dados posteriores
5	67,68,85,86, 88	APACC F	«3 meses	Canil APAAC	Febendazol+Milbemicina 14/8/20	Após desparasitação
6	94	Boneco(HVS)F	3 meses	HVS-consulta	Telmin	Após desparasitação; gato de rua infestação por pulgas/coriza
7	95	INIAV F				Iniav22952
8	10,27,28,29,30,31,32,55, 56,57	King F		Casa encontrado na rua	Strongid a 21/9/20	Após desparasitação dc 29/9/20 fez caniquantel a 29/9/20
9	M1,M2,M3	Marelinho F	«6 meses	Casa	Pirantel (fev) strongid maio	Gato de casa que veio da rua; amostra depois do strongid em Maio
9'	9,69	Marelinho	«6 meses	Casa	Strongid (mai)	8/8/20 esta amostra é antes do novo strongid
9''	49,50,51,52,53,73,74,75, 76,77, 78,79,80,81	Marelinho	«6 meses	Casa	Strongid 8/8	Após 30h de strongid, dc 10/08/20
10	2	Fá F	4 meses	Rua (campo)	Não	230 OGF com amostra
10'	3	Fá				larvas vivas e ovos 1 semana após desparasitação
11	11	Dó F				1 adulto sem ovos 1 semana após 1ª desparasitação, dc 8/10/20
11'	62	Dó				19/10 1 adulto imediatamente após a 2ª desparasitação com strongid
12	23,24,25,26,33,34,35,36, 37,38, 39,40,41,42,43	Sol F				Dc 06/10/20
12'	1,6 (fezes),7(fezes), 12,18,19,20,21,22	Sol				adultos e ovos (tenho amostras de fezes)1 semana após desparasitação dc 7/10
12''	72	Sol				1 adulto imediatamente após a 2ª desparasitação
13	14,15,44,45,46,47,48,59	Re F				8/10adultos sem ovos 1 semana após desparasitação
14	16,17,58,60,61	Mi F			Strongid a 7/10/20	2 adultos sem ovos amostra de 8/10
14'	84	Mi				19/10 imediatamente após a 2ª desparasitação
15	83	Cão	2 meses	apaac	não desparasitado	24/09 1 adulto (vomitou o parasita)
16	93	Vito	4 meses	HVS consulta	sem desparasitação	Cão de casa
17	13,70,71,79	? cão				dc18/07/20
18	82	? Cão	«6 meses	Canil APAAC	Não	Sem dados
19	96					Sem dados

Tabela3- Caracterização das amostras colhidas

Legenda - A ITS2 cat; B ITS 2 can; C *nad*; D *cox*; E *coi*; F 18S; G tubulina; H codão 167; I codão 198; J codão 200.

QUANTIFICAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS EM ESTUDO

Sample ID	Nucleic Acid Conc.(ng/μl)	A260	A280	260/280	260/230	Factor
1A	9,7	0,193	0,205	0,94	-0,06	50
1B	12,6	0,252	0,262	0,97	-0,08	50
1C	2,7	0,055	0,022	2,49	0,06	50
1D	288,6	5,772	3,872	1,49	1	50
5A	4,9	0,099	0,103	0,96	-0,03	50
5B	6,1	0,122	0,091	1,34	0,23	50
5C	8,7	0,173	0,208	0,83	-0,05	50
5D	17,4	0,347	0,362	0,96	-0,12	50
5E	22,5	0,449	0,456	0,99	-0,16	50
8	1615,1	32,303	15,516	2,08	1,56	50
9	402,7	8,054	4,266	1,89	1,05	50
10	5,9	0,118	0,115	1,03	0,17	50
10	6	0,12	0,122	0,98	0,17	50
11	6,4	0,127	0,101	1,26	0,23	50
12	234,6	4,693	2,386	1,97	1,07	50
13	3574,1	71,483	37,417	1,91	0,79	50
14	66,1	1,322	0,769	1,72	0,5	50
15A	15,7	0,314	0,329	0,95	-0,1	50
15B	1,8	0,036	0,032	1,13	0,17	50
15C	19	0,38	0,373	1,02	-0,13	50
15D	1408,3	28,167	15,303	1,84	0,69	50
16	14,3	0,286	0,225	1,27	0,28	50
17	80,5	1,609	1,37	1,17	0,31	50
18	-758,2	-15,164	-13,313	1,14	1,55	50
19	76,6	1,531	1,248	1,23	0,17	50
20	177,3	3,547	3,128	1,13	0,27	50
21	58,1	1,163	1,004	1,16	0,12	50
22	122,7	2,454	2,171	1,13	0,2	50
23	440,9	8,817	7,692	1,15	0,7	50
24	334,1	6,682	5,775	1,16	0,15	50
25	164,2	3,284	2,468	1,33	0,35	50
26	1072,3	21,446	16,626	1,29	0,5	50
27	171	3,42	1,644	2,08	1,37	50
28	56,4	1,127	0,72	1,57	0,67	50
29	8	0,16	0,125	1,28	0,16	50
30	22,1	0,441	0,368	1,2	0,22	50
31	9,9	0,197	0,159	1,24	0,14	50
32	132,6	2,652	1,262	2,1	1,02	50
33	7252,7	145,054	73,46	1,97	1,89	50
34	10,1	0,202	0,206	0,98	0,12	50
35	159,5	3,191	1,53	2,09	1,14	50
36	534,5	10,69	5,049	2,12	1,64	50
37	213,4	4,268	2,072	2,06	1,14	50
38	251,7	5,034	2,381	2,11	1,41	50
39	164,4	3,288	1,551	2,12	1,33	50
40	23,3	0,467	0,368	1,27	0,26	50
41	149,1	2,982	1,408	2,12	1,66	50

42	5,8	0,117	0,114	1,02	0,1	50
43	92,3	1,847	0,876	2,11	1,25	50
44	125,8	2,515	1,227	2,05	1,24	50
45	56,6	1,133	0,591	1,92	0,99	50
46	1,2	0,025	0,011	2,34	0,04	50
47	5,1	0,102	0,07	1,47	0,28	50
48	27,6	0,552	0,274	2,01	0,67	50
49	428,9	8,577	4,098	2,09	1,7	50
50	109,1	2,181	1,056	2,06	1,22	50
51	55,4	1,108	0,55	2,01	0,99	50
52	2305,6	46,113	31,021	1,49	1,34	50
53	163,8	3,276	1,564	2,09	1,59	50
54	2070	41,399	23,669	1,75	0,79	50
55	4,9	0,098	0,055	1,79	0,09	50
56	12,4	0,248	0,117	2,13	0,43	50
57	4	0,081	0,05	1,61	0,09	50
58	5,5	0,11	0,087	1,26	0,11	50
59	576,9	11,538	6,981	1,65	0,91	50
60	248,8	4,976	2,608	1,91	0,95	50
61	274,1	5,481	2,684	2,04	1,22	50
62	449	8,979	4,85	1,85	0,94	50
63	702,3	14,047	6,954	2,02	1,3	50
64	1354,8	27,097	13,308	2,04	1,36	50
65	1166,2	23,325	11,801	1,98	1,02	50
66	240,8	4,816	2,298	2,1	1,34	50
67	28,9	0,578	0,284	2,03	0,61	50
68	87,8	1,756	0,859	2,05	0,89	50
69	326	6,521	3,109	2,1	1,26	50
70	655,9	13,118	8,083	1,62	0,59	50
71	830,1	16,601	11,026	1,51	0,65	50
72	783,2	15,663	8,163	1,92	0,92	50
73	694,1	13,883	6,859	2,02	0,98	50
74	452	9,041	4,854	1,86	0,78	50
75	1088,6	21,772	10,503	2,07	1,27	50
76	42,5	0,851	0,611	1,39	0,17	50
77	49,7	0,993	0,679	1,46	0,08	50
78	195,9	3,918	2,151	1,82	0,54	50
79	83,3	1,666	0,947	1,76	0,2	50
80	59	1,181	0,697	1,69	0,17	50
81	49,6	0,992	0,59	1,68	0,14	50
82	570,5	11,41	9,095	1,25	1,08	50
83	430,9	8,618	8,031	1,07	0,72	50
84	132,6	2,652	1,697	1,56	0,31	50
85	53,2	1,065	0,758	1,4	0,14	50
86	33,4	0,668	0,493	1,36	0,1	50
87	113,5	2,27	1,305	1,74	0,11	50
88	26,5	0,529	0,319	1,66	0,09	50
89	214	4,281	3,504	1,22	0,33	50
90	701,2	14,025	8,997	1,56	0,93	50
91	476,1	9,522	4,99	1,91	0,83	50
92	573,4	11,469	6,097	1,88	1	50

93	342,3	6,846	4,389	1,56	0,64	50
94	221,5	4,43	3,674	1,21	0,47	50
95	101	2,019	1,131	1,79	0,63	50
96	0,6	0,012	0,006	1,92	-0,12	50
L1	202,6	4,052	2,012	2,01	1,89	50
L2	174,7	3,493	1,911	1,83	1,29	50

Tabela 4 Quantificação de DNA das 96 amostras (05-05-2021)