



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**Desenvolvimento de vacina para a toxocaríase a partir de proteína recombinante de *Toxocara canis* e suplementação com sobrenadante probiótico em modelo murino de toxocaríase**

Lourdes Helena Rodrigues Martins

**Orientador (a): Prof. Dra. Luciana Farias da Costa de Avila**

RIO GRANDE

2026



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA A TOXOCARÍASE A  
PARTIR DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *TOXOCARA CANIS* E  
SUPLEMENTAÇÃO COM SOBRENADANTE PROBIÓTICO EM MODELO  
MURINO DE TOXOCARÍASE**

Lourdes Helena Rodrigues Martins

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para obtenção do título de Mestre

RIO GRANDE, 2026

**DESENVOLVIMENTO DE VACINA PARA TOXOCARIÁSE A PARTIR  
DE PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *TOXOCARA CANIS* E  
SUPLEMENTAÇÃO COM SOBRENADANTE PROBIÓTICO EM MODELO  
MURINO DE TOXOCARIÁSE**

Lourdes Helena Rodrigues Martins

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para obtenção do título de Mestre

**Banca Examinadora**

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

Prof. Dra. Vanice Rodrigues Poester (PPGCS- FURG)

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

Dr. Clovis Moreira Junior (CDTec - UFPEL)

Dra. Débora Carvalho Rodrigues (PPGCS-FURG -Suplente)

## AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todos os meus familiares que são a base da minha vida, expresso a minha gratidão por estarem sempre junto de mim, mostrando que juntos somos mais fortes para enfrentar todos os momentos. Ao longo da caminhada me proporcionaram momentos agradáveis, belas risadas tornando meus finais de semanas mais leve e me incentivando a não desistir dos meus sonhos. Em especial a meus irmãos: Carmen, Elaine e Jorge.

Aos meus filhos e netos que são os meus maiores tesouros; Maicon Patrick, Pablo Michel, Miguel, Joaquim, Stacy. São elos sagrados, são continuidade da nossa família, a luz que me guia e que levarão adiante todos os valores e amor recebidos, nos ensinam a cada dia o valor do amar sem medidas e da gratidão.

As minhas sobrinhas(os) Michele, Milene, Daniel, Mayame, Maiélen, Evelyn, Matheus, Guilherme e Valenthina que são muitos especiais para mim, cada um deles me deram um sentido novo a minha vida. Agradeço a Deus por todo carinho, amor e amizade.

A técnica do laboratório Nudefa, colega e amiga Rosemarlei gostaria de agradecer pelo apoio contínuo, pelas palavras de incentivo, pelo carinho.

As minhas amigas e colegas de mestrado Carolina Netto, Muna Yussef e Andrezza Medeiros, Victória Panassolo, Mariana que ao longo da minha trajetória me incentivaram e me ensinaram. Agradeço a colaboração, a troca de experiência que enriqueceram meu percurso acadêmico e o companheirismo das horas compartilhada de lazer com um bom café, as viagens programadas durante o ano, com certeza esses momentos nos aproximou mais e nos tornou pessoas melhores. O apoio de vocês foi muito gratificante para superarmos os desafios diários. Obrigado pelo comprometimento, e pela parceria nos projetos que superamos juntas durante toda a nossa caminhada, agradeço de coração por toda ajuda, foi um prazer imenso trabalhar com vocês e poder contar com cada uma nesse momento importante da minha vida.

Ao Grupo NEP- Núcleo de Estudos em Parasitologia pelos ensinamentos, a todos os professores do laboratório de Parasitologia que inspiram, ensinam e transformam a nossa vida em especial a Prof. Vera Signorini, Prof. Maria Lix Dionello, Prof. Lulie Susin, Prof. Luciana Avila; Prof. Fabiane Gatti gostaria de expressar a minha gratidão pelo apoio e ensinamentos durante o período no setor, a paixão de vocês pelo ensino e a pesquisa foram fundamentais para despertar a minha curiosidade e moldar a minha formação acadêmica. Com meus melhores cumprimentos e gratidão eterna ao meu chefe Prof. Dr. Carlos J. Scaini (*in memoriam*) pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa. Suas

contribuições científicas e valiosas moldaram esse trabalho e foram fundamentais para o meu crescimento e desenvolvimento como pesquisadora.

A minha orientadora, Profa. Luciana Farias da Costa de Avila, gostaria de agradecer pelo carinho, amizade, inspiração, pelas palavras de conforto em todos os momentos, pela paciência e pelos ensinamentos ao longo do mestrado que foram muito importantes para a elaboração dessa dissertação pois me proporcionaram um grande aprendizado. Sua orientação foi fundamental em cada etapa para o meu crescimento pessoal e profissional. Ao CDTEC (Centro de Desenvolvimento Tecnológico) da Universidade Federal de Pelotas gostaria de agradecer imensamente pela parceria, pelo trabalho em especial ao Prof. Dr. Clóvis Moreira Junior e a sua equipe envolvida no desenvolvimento da vacina foram fundamentais para que esse projeto fosse concluído.

Ao Biotério setorial da FAMED-FURG e aos técnicos do biotério, Márcia, Ana e a médica veterinária Livia por todo o apoio e colaboração durante todo o meu experimento que foi muito essencial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG que permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Linha do tempo mostrando a administração do SLC de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469, a aplicação das três doses da vacina e a inoculação de <i>T. canis</i> em camundongos Swiss.....	27
<b>Figura 2.</b> Média do número de larvas de <i>Toxocara canis</i> recuperadas no fígado de camundongos <i>Swiss</i> experimentalmente infectados que receberam: vacina rTES 30 (G1), suplementação com SLC de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 mais vacinas rTES 30 (G2), somente infectados com <i>T. canis</i> (G3) e controle negativo sem infecção (G4) .....	29
<b>Figura 3.</b> Cinética da produção de anticorpos IgG em camundongos <i>Swiss</i> vacinados com rTES 30 e experimentalmente infectados por <i>T. canis</i> (G1 e G2) e não vacinados .....	30
<b>APÊNDICE I.</b> Análise individual, em diferentes tempos de coleta, da quantificação de anticorpos IgG de acordo com os grupos experimentais: G1 (vacinação com rTES30), G2 (vacinação com rTES30 e suplementação com SLC de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC7469), G4 controle negativo.....	48
<b>ANEXO I.</b> Documento aprovado pela Comissão De Ética Em Uso Animal (CEUA-FURG) sob parecer nº33, processo nº23116.003397/202-75.....	49

## RESUMO

**MARTINS, L.H.R. Desenvolvimento de vacina para toxocaríase a partir de proteína recombinante de *Toxocara canis* e suplementação com probiótico em modelo murino de toxocaríase 2026. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.**

**Introdução:** A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual crônica e uma zoonose de ampla distribuição mundial, representando relevante problema de saúde pública devido à elevada soroprevalência global e à eficácia limitada dos anti-helmínticos disponíveis. Os antígenos de excreção/secreção (TES) de *T. canis* têm se destacado como moduladores da resposta imune, e a proteína recombinante rTES30, produzida a partir do TES nativo, demonstra reatividade com anticorpos de hospedeiros infectados, apresentando resultados promissores no imunodiagnóstico da toxocaríase. A partir desse conhecimento, este estudo avaliou a capacidade imunogênica da proteína recombinante rTES30 como vacina, na proteção contra a infecção por *T. canis* em modelo murino. **Materiais e Métodos:** A rTES30 foi administrada por via subcutânea em três doses de 50 µg (nos dias zero, 14 e 28). Camundongos *Swiss* foram divididos em quatro grupos: G1- vacinados e infectados; G2- suplementados com o sobrenadante livre de células de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, vacinados e infectados; G3- apenas infectados; G4- controle negativo. Exceto G4, todos foram inoculados com 100 ovos de *T. canis* no dia 38, por via intragástrica. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 14, 28, e 40 pós-vacinação, com eutanásia no dia 40, seguida de digestão tecidual para quantificação de larvas. Avaliou-se a cinética de produção de anticorpos IgG por ELISA. **Resultados:** A imunização com rTES30 não promoveu proteção contra *T. canis*, sem redução de larvas teciduais. Anticorpos IgG específicos foram detectados após vacinação, entretanto, não se traduziram em proteção efetiva. O uso de SLC *L. rhamnosus* 7469 previamente à vacinação não reduziu a carga parasitária, apesar de modular a resposta imune. **Conclusão:** A sequência antigênica utilizada para a produção da rTES30 neste estudo não impediu a invasão ou migração larval. Futuras abordagens devem considerar adjuvantes robustos, combinações antigênicas ou estratégias heterólogas para potencializar a imunidade protetora.

**Palavras chave:** Toxocaríase; Vacina; Proteína recombinante; Resposta imune

## ABSTRACT

**MARTINS, L.H.R. Development of a vaccine for toxocariasis from recombinant protein of *Toxocara canis* and supplementation with probiotic in a murine model of toxocariasis 2026. Dissertation (Master's) – Graduate Program in Health Sciences. Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS.**

**Introduction:** Human toxocariasis is a chronic tissue parasitosis and a zoonosis with a worldwide distribution, representing a significant public health problem due to its high global seroprevalence and the limited effectiveness of available anthelmintics. The excretion/secretion antigens (TES) of *T. canis* have stood out as modulators of the immune response and the recombinant protein rTES30, produced from native TES, demonstrates reactivity with antibodies from infected hosts, showing promising results in the immunodiagnosis of toxocariasis. Based on this Knowledge, this study evaluated the immunogenic capacity of the recombinant protein rTES30 as a vaccine in protection against infection *T. canis* infection in a murine model. **Materials and Methods:** rTES30 was administered subcutaneously in three doses 50 µg (on days 0, 14, and 28). Swiss mice were divided into four groups: G1 - vaccinated and challenged; G2 - supplemented with the cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, vaccinated and challenged; G3 - only challenged; G4 - negative control. Except for G4, all were inoculated with 100 eggs of *Toxocara canis* on day 38, via intragastric injection. Blood samples were collected on days 14, 28, and 40 post-vaccination, with euthanasia on day 40, followed by tissue digestion for larval quantification. The kinetics of IgG antibody production were evaluated by ELISA. **Results:** Immunization with rTES30 did not provide protection against *T. canis*, with no reduction in tissue larvae. Specific IgG antibodies were detected after vaccination; however, they did not translate into effective protection. The use of SLC *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 prior to vaccination did not reduce the parasite load, despite modulating the immune response, evidenced by changes in the humoral profile. **Conclusion:** The antigenic sequence used did not prevent larval invasion or migration. Future approaches should consider robust adjuvants, antigen combinations, or heterologous strategies to enhance protective immunity.

**Keywords:** Toxocariasis; Vaccine; Recombinant proteins; Immune response

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	<b>12</b>
2.1 <i>Toxocara canis</i> e Toxocaríase humana .....	12
2.2. Resposta imune na toxocaríase e proteínas de <i>Toxocara canis</i> (TES) .....	14
2.3. Desenvolvimento de vacinas para helmintos.....	16
2.4 Utilização de probióticos contra agentes infecto-parasitários.....	18
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
3.1. Objetivo geral .....	21
3.2. Objetivos específicos .....	21
<b>4. MANUSCRITO</b> .....	<b>22</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	23
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.2.1 Recuperação de <i>T. canis</i> e cultivo dos ovos do parasito .....	24
4.2.2 Produção da proteína recombinante e da vacina Vac-rTES30 .....	24
4.2.3 Cultivo do probiótico <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 e produção do sobrenadante livre de células .....	25
4.2.4 Delineamento Experimental .....	26
4.2.5 Avaliação da ação vacinal sobre a carga parasitária .....	27
4.2.6 Investigação da cinética da produção de anticorpos .....	27
4.2.7 Análise estatística .....	28
4.3 RESULTADOS.....	28
4.4. DISCUSSÃO .....	30
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>
<b>7. APÊNDICE I</b> .....	<b>48</b>
<b>8- ANEXO I</b> .....	<b>49</b>
<b>9- ANEXO II</b> .....	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O nematódeo *Toxocara canis* é um parasito zoonótico de importância socioeconômica global, responsável por infecções em animais e humanos, com maior incidência em regiões tropicais e subtropicais. (Gasser et al., 2015). Do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública, a toxocaríase é considerada uma zoonose negligenciada, de difícil controle e amplamente distribuída tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Por ser uma doença subdiagnosticada e subnotificada, a implementação de estratégias eficazes de controle e vigilância epidemiológica são dificultadas (Despommier, 2003, Hotez et al., 2008; WHO, 2020). Sua elevada prevalência é favorecida por fatores como condições sanitárias precárias, elevada população de cães errantes e intensa contaminação ambiental por ovos larvados, o que contribui para a manutenção do ciclo do parasito (Rubinsky-Elefant et al., 2010, Ma et al.; 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017), estima-se que na América Latina e América do Norte, aproximadamente uma em cada mil pessoas esteja afetada por zoonoses parasitárias, incluindo a toxocaríase (Despommier, 2003; Hotez et al., 2014; Ma et al., 2018). Embora muitos casos sejam subclínicos ou assintomáticos a toxocaríase representa impacto clínico relevante para a saúde pública, principalmente em populações vulneráveis (Rostami et al., 2019; Fakhri et al., 2018).

A toxocaríase humana é causada principalmente pelas larvas de *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, parasitos de cães e gatos domésticos que podem infectar o homem de forma acidental, sendo considerada uma das principais doenças negligenciadas do mundo (Rostami et al., 2019). As manifestações clínicas da toxocaríase estão diretamente relacionadas à interação entre a carga larval e o perfil da resposta imune do hospedeiro, que desempenha papel central tanto na limitação da infecção quanto na patogênese associada (Mazur-Melewska Katarzyna et al., 2020; Leal-Silva T et al., 2022). As principais apresentações incluem: a. Larva *migrans* visceral que é a forma mais comum, caracterizada por febre, hepatomegalia, eosinofilia e manifestações respiratórias como tosse e sibilância resultantes da migração larval (Magnaval et al., 2001; Fillaux e Magnaval, 2013); b. Larva *migrans* ocular, constitui a forma mais localizada que pode causar a inflamação intraocular, retinite e formação de granulomas. Essas alterações podem levar o indivíduo ao comprometimento visual unilateral, e, em casos mais graves podem evoluir para perda permanente da visão, associada a complicações como vitrite, edema macular cistoide e descolamento tracional da retina (Taylor et al., 2001; Fan et al., 2015; Ma et al., 2018); c. Toxocaríase oculta, que se apresenta sintomas inespecíficos

como dor abdominal, tosse, cefaleia, anorexia e alterações comportamentais. (Rubinsky-Elefant et al., 2010; Fillaux e Magnaval, 2013); d. neurotoxocaríase, embora rara e frequentemente descrita em relatos de caso em adultos de meia idade, resulta da migração larval para o sistema nervoso central, podendo manifestar-se como meningite, encefalite, vasculite cerebral ou mielite (Ma et al., 2018; Finsterer e Auer, 2007). Esses quadros clínicos estão associados a sintomas neurológicos inespecíficos, além de possíveis associações com distúrbios psiquiátricos incluindo convulsões, atrasos no desenvolvimento e déficits cognitivos e degenerativos (Nicolleti, 2020).

Além das medidas de controle ambiental e do tratamento anti-helmíntico em animais, torna-se necessária a busca por estratégias imunoproláticas alternativas, como o desenvolvimento de vacinas baseadas em proteínas recombinantes. Esse enfoque é justificado pela complexidade biológica de *Toxocara spp.*, pela capacidade das larvas de modularem a resposta imune do hospedeiro e pela dificuldade de obtenção de antígenos nativos em quantidade e pureza adequadas, o que limita a eficácia e a padronização de vacinas convencionais (Hotez et al., 2008; Maizels; Mc Shorley, 2016).

Proteínas recombinantes, incluindo peptídeos antigênicos, são produzidas por meio de técnicas de engenharia genética, nas quais genes de interesse do parasito são clonados e expressos heterologicamente em sistemas como bactérias e leveduras. A utilização da recombinação gênica permite a obtenção de antígenos altamente específicos, com elevado grau de pureza, segurança e reprodutibilidade, contribuindo para uma melhor caracterização imunológica. Desta forma, tais estratégias representam uma alternativa promissora para a prevenção da toxocaríase e de outras helmintíases negligenciadas (Zawawi et al., 2020; Bottazzi et al., 2021).

Para populações em situação de vulnerabilidade social, especialmente crianças residentes em áreas com elevada contaminação ambiental e acesso limitado a saneamento básico e à assistência veterinária para seus animais, a existência de vacinas para a prevenção da toxocaríase pode representar uma estratégia preventiva de grande impacto, ao diminuir a incidência da infecção, prevenir formas graves como a toxocaríase visceral e ocular, e reduzir complicações associadas à inflamação crônica e ao comprometimento do desenvolvimento físico e cognitivo (Hotez e Wilkins, 2009; Fan et al., 2015).

Nesse contexto, o uso de tecnologias recombinantes contribui não apenas para o avanço científico, mas também para a promoção da equidade em saúde, ao oferecer alternativas seguras, eficazes e acessíveis para o controle de uma zoonose negligenciada. Além disso, estratégias adjuvantes baseadas na modulação da microbiota intestinal têm

sido amplamente investigadas no contexto da imunoprofilaxia. Probióticos e seus derivados, como metabólitos presentes no sobrenadante de cultivo (pós-bióticos), apresentam potencial imunomodulador, sendo capazes de influenciar a ativação de células do sistema imune inato e adaptativo, bem como a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar uma vacina baseada na proteína recombinante rTES 30 de *T. canis* e seu uso associado à suplementação com sobrenadante de probiótico, visando à indução de resposta imune protetora e à redução da infecção em modelo murino.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Toxocara canis* e Toxocaríase humana**

A toxocaríase é uma parasitose tecidual crônica, com importante distribuição mundial, associada a presença de cães e gatos em ambientes domésticos e à contaminação de solo por ovos de *Toxocara* spp. (Bowman, 2020; Fu et Al., 2024). O nematódeo *T. canis* se desenvolve no intestino delgado de cães, que atuam como hospedeiros definitivos e eliminam ovos no ambiente por meio das fezes. Os ovos tornam-se infectantes após um período no solo, contribuindo para a manutenção do ciclo do parasito (Holland, 2017). O convívio humano com esses animais, especialmente em famílias de baixa renda e em regiões rurais, constitui um fator de risco para infecção. Estudos utilizando técnicas parasitológicas e moleculares demonstram a contaminação do solo por ovos de *Toxocara* sp. em parques públicos, representando um prejuízo a saúde de pessoas que frequentam esses locais, especialmente crianças (Otero et al., 2018; Bonilha-Aldana et al., 2023).

A prevalência da toxocaríase em humanos apresenta ampla variação entre diferentes regiões e populações. Apesar de milhões de pessoas estarem infectadas, é necessário compreender quantas estão expostas ao parasito e quantas realmente adoecem (Ma et al., 2018). Entretanto, é importante salientar que a prevalência estimada pode ser afetada de acordo com a sensibilidade e especificidade do método diagnóstico aplicado (Rostami et al., 2020). O sorodiagnóstico pode ser aplicado tanto em humanos como animais, sendo amplamente utilizados em inquéritos epidemiológicos (Fillaux & Magnaval, 2013; Ma et al., 2018); embora apresente limitações relacionadas à reatividade cruzada e à dificuldade de diferenciar infecção ativa de exposição prévia, o que tem motivado o desenvolvimento de antígenos recombinantes mais específicos (Noordin et al., 2020).

Um estudo de meta-análise indicou que 19% da população mundial é soropositiva para *T. canis*, com taxas mais altas na África (37,7%) e mais baixas no Mediterrâneo Oriental (8,2%), sendo os principais fatores de risco: residir em áreas rurais, idade com maior soroprevalência observada principalmente em crianças na faixa etária de 1 a 14 anos, contato com pets, consumo de carne crua e água não tratada (Rostami et al., 2019). Esses dados reforçam a necessidade de fortalecimento de políticas públicas voltadas ao controle dessa zoonose, com abordagem integrada em saúde única, incluindo educação em saúde, manejo adequado de animais, desparasitação periódica e melhoria das condições de saneamento básico, medidas essenciais para interromper as vias de transmissão do parasito (Ma et al., 2018; WHO, 2020).

Humanos e outros hospedeiros paratênicos, como roedores, aves, ruminantes, suínos adquirem a toxocaríase pela principalmente pela ingestão de ovos de *T. canis* embrionados, mas também pode ocorrer por meio do consumo de carnes ou vísceras cruas ou malcozidas contendo larvas do parasito (Nijssse, 2016; Xu e Han, 2024.). Após a ingestão, as larvas penetram na parede intestinal, entram na circulação sanguínea, podendo migrar por diferentes partes do corpo, levando a uma resposta inflamatória acentuada e gerando vários sintomas clínicos, dependendo do órgão envolvido (Fan, 2015; Chen et al., 2018; Al-Awadhi e Jamal, 2022). Durante a migração as larvas de *T. canis* podem se alojar em vários órgãos e tecidos como: fígado, pulmões, coração, rins, encéfalo, olhos e músculos esqueléticos estriado. A presença de larvas nesses tecidos induz várias alterações patológicas de acordo com sua capacidade migratória e das respostas imunológicas do hospedeiro, o qual pode permanecer assintomático ou desenvolver diferentes formas clínicas: larva migrans visceral (LMV), larva migrans ocular (LMO), neurotoxocaríase (NT) e toxocaríase oculta/comum (Xu e Han, 2024; Ma et al., 2018).

A suspeita clínica da toxocaríase é um desafio pois a maioria das manifestações clínicas é inespecífica, variando de acordo com o grau da infecção e do órgão afetado, podendo causar diversos sintomas e sinais clínicos no organismo como: febre, dor abdominal, tosse, mal-estar, perda de peso, irritabilidade, erupções cutâneas, distúrbios respiratórios e manifestações neurológicas ou oculares (Raissi et al.; 2021).

A confirmação da infecção costuma ser realizada por meio de diagnóstico sorológico *in house*, no qual é feita a pesquisa de anticorpos IgG utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) ou Western blot, que utilizam antígenos de excreção e secreção (TES) nativos das larvas de *T. canis* (Roldán et al., 2015). Entretanto, a

utilização do TES nativo é dependente do cultivo *in vitro* de larvas L3 de *T. canis*, o que resulta em variações na composição antigênica e pode comprometer a padronização. Além disso, a sensibilidade e especificidade podem ser influenciada devido à ocorrência de reação cruzada com outros helmintos, principalmente *Ascaris lumbricoides* (Roldán et al., 2017; Skulinová et al., 2022).

Em relação ao tratamento da toxocaríase, este é realizado com medicamentos anti-helmínticos que, embora sejam amplamente utilizados apresentam eficácia moderada nos tecidos extraintestinais. Apesar do albendazol ser a principal escolha terapêutica, sua eficácia deve ser avaliada com mais precisão pois é condicionada por vários fatores como: estágio da infecção e localização das larvas, representando ainda um desafio para tratar a forma ocular e neurológica (Magnaval et al., 2001; Magnaval et al., 2022). As abordagens terapêuticas podem diferir de acordo com a forma clínica da doença, sendo o albendazol o fármaco de escolha e, frequentemente, associado ao uso de corticoides quando os casos clínicos apresentam intensa resposta inflamatória, como no caso da toxocaríase neurológica, na qual a terapia antiparasitária é associada ao rigoroso controle da resposta inflamatória (Despommier, 2003; Hewitson e Maizels, 2014).

## **2.2. Resposta imune na toxocaríase e proteínas de *Toxocara canis* (TES)**

Estudos envolvendo a infecção por *T. canis* têm demonstrado que o parasito modula a resposta imunológica do hospedeiro a fim de favorecer sua sobrevivência em longo prazo; contudo, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são pouco compreendidos (Maizels et al., 2016). Na resposta imune gerada por *T. canis*, inicialmente ocorre aumento de células Th1, com liberação das interleucinas 12 (IL-12) e Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), com atuação na destruição das larvas (Avila et al., 2016; Dlugosz et al., 2019). Paralelamente, a liberação de produtos excretorios-secretorios (TES) pelas larvas de *T. canis* aumenta essa polarização Th2 e pode causar danos significativos aos tecidos (Vacca e Le Gros, 2022; Lekki-Józwiak e Baska, 2023). Essa resposta é caracterizada pelo recrutamento e pela ativação de células do sistema imune inato como: células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), basófilos e eosinófilos. Essas células promovem pelo aumento na produção de citocinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, levando à ativação de linfócitos Th2 e células B, que, por sua vez, induzem à produção de anticorpos de classe IgE e IgG1. As larvas infectantes de *T. canis* liberam antígenos de excreção e secreção (TES), que possuem moléculas como arginase, cistatina, calreticulina e catepsinas, com propriedades imunomoduladoras

que garantem a sobrevivência do parasito (Silva et al., 2018). Esses componentes derivados do TES, individualmente ou em combinação, são utilizados pelo parasito para suprimir funções biológicas importantes como: o estabelecimento de infecção, modulação imunológica, competição intraparasitária e proteção contra as defesas do hospedeiro (Wangchuck et al., 2020).

Silva et al. (2018) identificaram 582 proteínas do extrato larval e 64 proteínas no antígeno de excreção e secreção (TES), incluindo moléculas imunomoduladoras envolvidas nos mecanismos de evasão e outras que podem estar envolvidas na patogenicidade do *T. canis*. A análise proteômica do TES, aliada ao sequenciamento transcriptômico de alto desempenho de 18.596 genes de *T. canis*, revelou um conjunto diversificado de proteínas, destacando a complexidade dos mecanismos que o parasito utiliza para interagir com o hospedeiro. Essa abordagem fornece dados fundamentais para o desenvolvimento de melhores métodos diagnósticos, terapêuticos, e estratégias preventivas contra a toxocaríase (Sperotto et al., 2017). Com base nesse estudo, uma série de proteínas foram identificadas como candidatas a vacina usando a vacinologia reversa. Essa técnica consiste na análise das sequências genômicas do patógeno de interesse por ferramentas de bioinformática, permitindo a predição de antígenos que podem ser bons candidatos ao desenvolvimento de uma vacina, sem necessidade de cultivar o organismo específico para obter os antígenos naturais (Rappuoli, 2000; Hasan et al., 2024; Taneja et al., 2025).

Nesse contexto, o desenvolvimento de antígenos recombinantes surge como uma alternativa promissora, permitindo maior controle da composição antigênica e melhor reprodutibilidade entre ensaios. Dentre as proteínas recombinantes previamente estudadas para diagnóstico, a proteína rTES-30 apresenta alta sensibilidade e especificidade para diagnosticar a infecção em humanos e animais (Santos et al., 2018; Noordin et al., 2020). Na técnica de ELISA indireta utilizando rTES30 foi verificada elevada acurácia diagnóstica com sensibilidade superior a 94%, podendo alcançar até 97,8% quando associada à confirmação com Western blot (Santos et al., 2018). Em outros estudos que avaliaram a capacidade antigênica dessas proteínas, foram observadas sensibilidade e especificidade em torno de 70% - 100% e 92% - 100%, respectivamente (Mohamad et al 2009; Zahabiun et al 2015).

Assim, pesquisas visando o desenvolvimento de novas alternativas de controle e tratamento como o uso de vacinas com antígenos TES recombinantes, tornam-se essenciais. Vacinas contra infecção por helmintos têm como objetivo atuar sobre as larvas

recentemente invasoras, a fim de minimizar a penetração e migração e a disseminação destas (Maizels; Mc Shorley, 2016; Claerebout e Geldhof, 2020).

### 2.3. Desenvolvimento de vacinas para helmintos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as vacinas contêm substâncias enfraquecidas ou inativadas de um organismo (antígeno) que desencadeiam uma resposta imune, permitindo que o sistema imunológico reconheça e combata o patógeno em futuras exposições, conferindo imunidade ao indivíduo. Ao reconhecer a presença de um antígeno invasor, os linfócitos T e B são ativados, iniciando uma resposta imune adaptativa mesmo na ausência de sintomas clínicos; esse processo resulta na formação de células de memória imunológica, fundamentais para a proteção a longo prazo (Cox e Brokstad, 2020).

Segundo Hotez et al. 2010, e Maizel e Mc Shorley 2016, o desenvolvimento de vacinas contra helmintos é desafiador devido a capacidade biológica que estes parasitos têm de modular a resposta imune do hospedeiro. Ainda assim, a vacinação prévia pode induzir uma resposta imune protetora, reduzindo a carga parasitária e favorecendo a expulsão de modo parcial ou total do parasito, ao atuar sobre as larvas invasoras, minimizar a duração da infecção e prevenir a migração e a disseminação do parasito (Zawawi e Else, 2020; Luna e Campos, 2020). A utilização de vacinas para controle e prevenção de doenças causadas por nematódeos vem apresentando resultados promissores em pequenos ruminantes (Tian et al., 2020; Gauci et al., 2023). As proteínas HcTTR e EG95NC se caracterizam como antígenos de interesse em imunologia parasitária, principalmente no desenvolvimento de vacinas. A proteína HcTTR, testada em caprinos contra *Haemonchus contortus*, promoveu uma redução de 63,7% na contagem de ovos e 66,4% de redução dos parasitos adultos (Tian et al., 2020). A proteína EG95NC, utilizada em ovinos desafiados com *Echinococcus granulosus*, proporcionou mais de 90% de proteção (Gauci et al., 2023). Esta proteína é considerada altamente imunogênica mesmo quando associada com adjuvantes convencionais, induzindo resposta imune protetora capaz de impedir a penetração e o desenvolvimento das larvas. Esse mecanismo envolve principalmente anticorpos que neutralizam a oncosfera (estágio larval inicial) logo após a infecção, bloqueando a migração tecidual (Lightowers et al., 2003; Heath et al., 2012).

Outros estudos com proteínas recombinantes também demonstraram proteção significativa contra nematódeos gastrointestinais, como ocorre com as vacinas contra

*Teladorsagia circumcincta* e *Haemonchus contortus*, que reduziu tanto a contagem de ovos quanto o número de adultos em ovelhas vacinadas. Esse conjunto de evidências reforça o potencial das estratégias baseadas em antígenos recombinantes para o controle de infecções parasitárias de importância econômica e sanitária (Miller e Horohov, 2006; Smith et al., 2013; Dalton et al., 2013).

A partir desse contexto, estratégias semelhantes para a prevenção da toxocaríase forma desenvolvidas usando proteínas recombinantes de *T. canis*. Jaramillo-Hernandez et al., (2022) observaram redução de 73% no número de larvas no tecido hepático, encefálico e muscular em modelos experimentais murinos vacinados com uma vacina produzida a partir da proteína rTcVcan, além de redução de ovos eliminados nas fezes de cães. A diminuição de larvas e ovos sugere que a vacina é capaz de estimular uma resposta imune eficaz que dificulta a disseminação e a sobrevivência das larvas, atuando de maneira preventiva e terapêutica, evitando complicações clínicas. De acordo com os autores, a vacinação é uma estratégia essencial para o controle da toxocaríase em cães, pois desempenha um papel importante para alterar o ciclo parasitário, reduzindo a viabilidade dos ovos, a presença destes no meio ambiente e a possibilidade de infecção humana.

Em outro estudo para a prevenção da toxocaríase, Garcés et al. (2020) testaram vacinas desenvolvidas com as proteínas recombinantes rTcCad e rTcVcan e observaram que houve redução da carga parasitária em modelo murino C57BL/6 de 52% e 53,2%, respectivamente. Apesar de os resultados serem satisfatórios, é relevante destacar que a dose de 500 ovos de *T. canis* utilizada no estudo pode não representar uma dose infectante realista. Segundo Cox e Holland (2001), menor carga parasitária de *T. canis*, reflete melhor a infecção em roedores e humanos. Assim, a avaliação de futuros candidatos vacinais deveria usar uma dose menor de ovos, a fim de simular melhor a infecção natural e permitir uma avaliação mais fidedigna da vacina.

Uma estratégia que vem sendo testada para potencializar a capacidade das vacinas em estimular a imunidade humoral e celular é o uso associado a adjuvantes, possibilitando que a vacina atinja seu potencial máximo (Han, 2015; Chan e Gack, 2016). Os adjuvantes exercem suas funções aumentando a eficácia dos antígenos por meio da estimulação do sistema imunológico inato, diretamente pela estimulação de células dendríticas (DCs), macrófagos e neutrófilos, que levam à ativação do sistema imune adaptativo (Bonam et al., 2017). Diversas são as abordagens baseadas na modulação da microbiota intestinal, como o uso de adjuvante vacinal, uma vez que a interação entre microbiota e sistema

imune influencia diretamente a magnitude e a qualidade da resposta imunológica induzida (Lynn et al., 2022; Hong, 2023; Ardura-Garcia et al., 2024). Por essa razão, adjuvantes que promovem resposta Th1 ou uma resposta mista Th1/Th2 balanceada têm sido mais promissores para vacinas contra *Toxocara* (Marthy- Roix et al., 2016).

Diante do exposto, proteínas recombinantes, além de apresentarem potencial para imunodiagnóstico, tornam-se fortes candidatas para o desenvolvimento de vacinas. No contexto da toxocaríase, proteínas derivadas de antígenos TES, como a rTES-30, tem sido amplamente investigada por sua elevada imunogenicidade e por estar diretamente envolvida na interação parasito-hospedeiro, sendo reconhecida pelo sistema imune durante a infecção natural, o que a torna uma candidata relevante para estratégias vacinais baseadas em proteínas recombinantes (Jacquier et al., 1991; Yamasaki et al., 2000; Santos et al., 2018).

#### **2.4 Utilização de probióticos contra agentes infecto-parasitários**

Microrganismos probióticos vêm sendo estudados como alternativas de controle e tratamento da toxocaríase em modelos experimentais e apresentam resultados promissores (Avila et al., 2012, Cadore et al., 2021, Walcher et al., 2023 Cunha et al., 2024). De acordo com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades apropriadas, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (Salminen et al., 2021). Além disso, o uso de probióticos está relacionado à expressão de receptores toll-like (TLRs), que são proteínas presentes nas células do sistema imune inato responsáveis por reconhecer padrões moleculares associados a microrganismos. A ativação desses receptores influencia a produção de IgA secretória, além de contribuir para o fortalecimento da barreira da mucosa intestinal, aumentando a integridade epitelial e a proteção de agentes patogênicos invasores (Kaur e Ali, 2022; Zheng et al., 2023).

Conforme mencionado, os efeitos benéficos dos probióticos ocorrem por meio da modulação da microbiota intestinal, da resposta imune e do fortalecimento da barreira epitelial, influenciando também a interação com outros microrganismos. Eles são utilizados tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças gastrointestinais, além de atuarem em diversos contextos clínicos associados a diferentes sintomas patológicos (Hill et al., 2014; Markowiak e Śliżewska, 2017; O'Toole et al., 2017; Sanders et al., 2019; Laranjeira, 2020).

Em infecções por helmintos, a microbiota intestinal desempenha papel fundamental na regulação da resposta imune, podendo influenciar a polarização Th2, a ativação de eosinófilos e a produção de IgE, além de interferir na capacidade do hospedeiro de limitar a migração e o estabelecimento larval (Reynolds et al., 2014; Ramanan et al., 2016). No intestino, os probióticos fortalecem a barreira epitelial, induzindo a produção de citocinas como IL-22 e IL-8, promovendo o aumento de secreção de muco pelas células caliciformes e dificultando a adesão de bactérias patogênicas. Além disso, algumas espécies possuem mecanismos capazes de neutralizar a ação de toxinas que afetam a permeabilidade da barreira epitelial (Bron et al., 2017).

Probióticos como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis* têm a capacidade de produzir moléculas imunomoduladoras no intestino durante a fermentação de carboidratos e outros substratos (Bermúdez-Humarán et al., 2019; Laranjeira, 2020). Segundo esses autores os efeitos neurotransmissores dos probióticos influenciam no eixo intestino-cérebro proporcionando melhoria e bem-estar ao organismo além de ação anti-inflamatória e imunomoduladora. Os probióticos exercem seus efeitos não apenas pela presença dos microrganismos vivos, mas também por meio de seus metabólitos liberados no meio de cultivo, presentes no sobrenadante, os quais apresentam propriedades imunomoduladoras. Esses compostos podem atuar diretamente sobre células do sistema imune, modulando a produção de citocinas e influenciando a polarização da resposta imune (Bermúdez-Humarán et al., 2019; Plaza-Díaz et al., 2019).

Nesse sentido, o uso de sobrenadantes livre de células (SLC), contendo metabólitos e compostos bioativos derivados de probióticos, representa uma abordagem promissora, pois permite explorar os efeitos imunomoduladores sem a necessidade da administração do microrganismo vivo, aumentando a segurança e a padronização experimental (Aguilar-Toalá et al., 2018; Salminen et al., 2021). Estudos demonstram que esses metabólitos podem induzir respostas pró-inflamatórias e/ou regulatórias, contribuindo para o equilíbrio entre respostas Th1 e Th2, o que é particularmente relevante em infecções por helmintos, nas quais a modulação da resposta imune é determinante para o desfecho da infecção (Wegh et al., 2019; Shi et al., 2020., Leal-Silva et al., 2021).

Alguns estudos têm demonstrado que os probióticos e seus metabólitos podem ser usados como adjuvantes, a fim de melhorar a resposta de vacinas. Vilanova (2020) em seu estudo sobre vacinas e imunidade com foco na prevenção de doenças infecciosas

causadas por vírus, observou que os adjuvantes são componentes importantes que potencializam a resposta imune no organismo, amplificando a resposta do sistema imunológico e permitindo, dessa forma, a produção de uma maior quantidade de anticorpos, além da ativação mais eficaz das células. Inic-Kanada et al. (2016) investigaram o uso de probióticos *Lactobacillus rhamnosus* como adjuvante na imunização contra *Chlamydia*, em modelos BALB/c. Os resultados mostraram aumento significativo da resposta imune específica, tanto local como sistêmica, com elevação nos níveis IgA na mucosa ocular e de IgG no soro. Além disso, foi observada uma ativação das células T CD4+ (T helper) com polarização para perfil Th1e Th17, indicando que o probiótico contribuiu para uma resposta celular eficaz, associada à produção de citocina como IFN- $\gamma$  e IL-17, importantes na defesa contra *Chlamydia*. Esses resultados sugerem que o uso do probiótico *L. rhamnosus* se constitui em uma abordagem inovadora e segura para o desenvolvimento de vacinas administradas por via de mucosa (oral, nasal e intestinal). Em outro estudo, foi avaliada a eficácia da vacina trivalente contra rotavírus em suínos gnotobióticos, nos quais *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) foi administrado por via oral em nove doses crescentes, variando de  $10^3$  a  $10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostraram que o uso do LGG como adjuvante potencializou significativamente a resposta imunológica induzida pela vacina (Parreno et al., 2022).

Nesse contexto, a combinação de antígenos recombinantes com estratégias imunomoduladoras baseadas em probióticos ou seus derivados pode representar uma abordagem integrada, capaz de potencializar a resposta imune protetora e interferir precocemente na migração larval, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da toxocaríase.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar se a vacina composta por proteína recombinante (Vac-rTES30) possui efeito imunogênico e capacidade de induzir proteção contra a infecção por *Toxocara canis* em camundongos Swiss.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o potencial da vacina Vac-rTES30 em reduzir a infecção experimental por *T. canis* em camundongos;

- Avaliar a capacidade imunogênica da vacina Vac-rTES30 quanto à indução de anticorpos específicos contra *T. canis* em modelo murino;

- Avaliar o papel potencializador do sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 como adjuvante na ação da vacina Vac-rTES30, para prevenir a infecção experimental de camundongos por *Toxocara canis*.

#### 4. MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido na revista Acta Tropica, ISSN (online): 1873-6254

Fator de impacto: 2,5

As normas de submissão podem ser consultadas em:

<https://www.sciencedirect.com/journal/acta-tropica/publish/guide-for-authors>

#### **Vacina desenvolvida com proteína recombinante rTES-30 demonstra imunogenicidade em modelo murino de toxocaríase experimental.**

Lourdes Helena Rodrigues Martins<sup>1</sup>, Oliver Barros<sup>2</sup>, Carolina Netto de Oliveira da Cunha<sup>1</sup>, Andrezza Faria<sup>1</sup>, Brunno Vaz de Bastos<sup>2</sup>, Victória Pires Panassolo<sup>1</sup>, Clóvis Moreira junior<sup>3</sup>, Gabriel Baracy Klafke<sup>4</sup>, Fabrício Rochedo Conceição<sup>3</sup>, Carlos James Scaini<sup>1†</sup>, Luciana Farias da Costa de Avila<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina (FAMED)/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande, General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

<sup>2</sup> Bolsista de iniciação científica. Laboratório de Parasitologia, FAMED-FURG

<sup>3</sup> Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTEC), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>4</sup> Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima S/nº Trindade, Florianópolis, Cep:88035972, Santa Catarina, RS, Brasil

**RESUMO:** A toxocaríase humana é uma importante zoonose negligenciada de impacto mundial causada pelo parasito *Toxocara canis* e, segundo a OMS, a doença permanece um desafio de saúde pública devido à ausência de métodos profiláticos eficazes. A prevenção da toxocaríase depende do desenvolvimento de imunógenos capazes de inviabilizar o estabelecimento da infecção e do processo inflamatório. Entre os antígenos candidatos a vacina, a proteína recombinante rTES30 tem sido investigada pelo seu potencial imunogênico. O presente estudo avaliou o potencial protetor da vacina produzida a partir de proteína recombinante de *Toxocara canis* rTES30 em modelo murino de infecção experimental. Camundongos *SWISS* receberam três doses de 50 µg da vacina produzida com antígeno recombinante rTES30 e posteriormente foram desafiados com 100 ovos embrionados de *T. canis*. Além disso, foi avaliado também se a

suplementação prévia com sobrenadante de *L. rhamnosus* melhora a resposta vacinal. A imunização com a proteína rTES30 resultou em soroconversão significativa, indicando que a rTES-30 é capaz de estimular a produção de anticorpos específicos contra *T. canis*. No entanto, a resposta humoral induzida não foi suficiente para promover a redução da carga larvária, demonstrando ausência de proteção efetiva. Este estudo reforça que, embora a rTES30 seja considerada imunogênica, sua utilização isolada não é suficiente para prevenir o estabelecimento da infecção por *Toxocara canis* em modelo murino. Diferentes abordagens vacinais baseadas em múltiplos antígenos recombinantes, associados ao uso de probióticos e seus metabólitos como adjuvantes imunológicos, podem representar estratégias inovadoras e promissoras para o controle da toxocaríase e devem ser exploradas em futuros estudos.

**Palavras chave:** Proteína recombinante; TES-30; Sobrenadante de probiótico; *Toxocara canis*.

#### 4.1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual crônica causada por nematódeos que vivem no intestino de cães e gatos, respectivamente nomeados de *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (Silva et al., 2022). A relevância do estudo de *T. canis* se justifica pela ampla distribuição geográfica, potencial zoonótico e elevadas taxas de soroprevalência, sobretudo em populações vulneráveis, configurando-se como um relevante problema de saúde pública (Despommier, 2003; Hotez et al., 2008; Rostami et al., 2019). Além disso, a toxocaríase é reconhecida como uma infecção de impacto global, associada a desigualdades socioeconômicas e frequentemente negligenciada em políticas públicas de saúde (Hotez e Wilkins, 2009; Rostami et al., 2019). A infecção acidental ocorre em humanos por meio da ingestão de ovos embrionados presentes no ambiente ou através de ingestão de carnes ou vísceras contaminadas com larvas infectantes (L3) (Lopez-Alamillo et al., 2025; Xu e Han, 2024; Bonilla-Aldana et al., 2023). Após a eclosão das larvas no intestino, estas migram por diferentes tecidos, ocasionando diferentes manifestações clínicas incluindo formas visceral, ocular e neurológica, além de quadros subclínicos que estão associados a respostas inflamatórias crônicas (Silva et al., 2022).

Durante o curso da infecção, as larvas de *T. canis* liberam antígenos de excreção e secreção (TES) que modulam a resposta imune do hospedeiro. Esses antígenos TES, individualmente ou em combinação, atuam no estabelecimento de infecção, na

modulação imunológica, na competição intraparasitária e na evasão das defesas do hospedeiro (Wangchuck et al., 2020). A produção de antígenos TES de forma recombinante (rTES) e o uso destes em modelos experimentais, têm revelado seu caráter antigênico, com destaque para a proteína de 30 kDa, a rTES-30 (Santos et al., 2018).

O investimento em medidas profiláticas é essencial para reduzir a exposição humana ao *T. canis*. O probiótico *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria com significativa capacidade de interação com o sistema imune de mucosa, promovendo o equilíbrio da microbiota e modulando respostas inflamatórias e regulatórias (Segers e Lebeer, 2014). Além disso, o uso do sobrenadante deste probiótico está relacionado a redução da infecção por *T. canis* (Walcher et al., 2023). Neste contexto, estratégias imunomoduladoras, como o uso de vacinas e probióticos, devem ser amplamente exploradas para o controle da toxocaríase. Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver uma vacina a partir da proteína rTES-30 e avaliar seu uso associado ao sobrenadante do probiótico *L. rhamnosus* na prevenção da infecção por *Toxocara canis* em modelo murino.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Recuperação de *T. canis* e cultivo dos ovos do parasito**

Cães infectados naturalmente com quatro a oito semanas de idade foram tratados com o anti-helmíntico pamoato de pirantel (15 mg/kg) por via oral. A seguir, foi realizada a histerectomia das fêmeas do parasito para a obtenção de ovos não embrionados, que foram incubados a 28°C, sob oxigenação diária por 30 dias (Avila et al., 2012).

### **4.2.2 Produção da proteína recombinante e da vacina Vac-rTES30**

O vetor recombinante pAE/tes30 foi usado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) star por choque térmico. O cultivo bacteriano foi mantido em caldo Luria-Bertani suplementado com 100 mg/ml ampicilina em shaker (37° C, 150 RPM) até a fase logarítmica de crescimento (DO600= 0,6- 0,8), quando a expressão da proteína heteróloga foi induzida pela adição de 0,5 mM de isopropil β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG) e mantido por 3 horas nas mesmas condições. Após, as células foram separadas por centrifugação (10.000 x g, 15 min, 4°C) e suspensas em tampão de lise (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol). As células foram lisadas pela adição de 50 mg/ml de lisozima por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação, seguido de 6 ciclos de 30 s de sonicação (60 KHz) e, então centrifugadas novamente (10.000 x g, 15 min, 4°C). Os

pellets contendo os corpos de inclusão foram solubilizados com tampão de lise contendo 8 M uréia por 16 h a 4°C. A proteína recombinante rTES30 foi purificada por cromatografia líquida de afinidade com níquel, utilizando coluna His Trap TM FF em sistema de cromatografia líquida automatizada AKTAprime TM (GE Healthcare). As frações purificadas em tampão de eluição (0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 8 M ureia e 500 mM imidazol) foram dialisadas contra tampão fosfato- salino (PBS, pH 7,4) por 16h a 4°C e quantificadas com kit BCATM Protein Assay (Pierce). A vacina Vac-rTES30 foi formulada utilizando 50µg de proteína recombinante em solução fisiológica (NaCl 0,9%) e adsorvidas em 15% de hidróxido de alumínio (Al (OH)<sub>3</sub>) como adjuvante (Santos et al., 2021).

#### **4.2.3 Cultivo do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 e produção do sobrenadante livre de células**

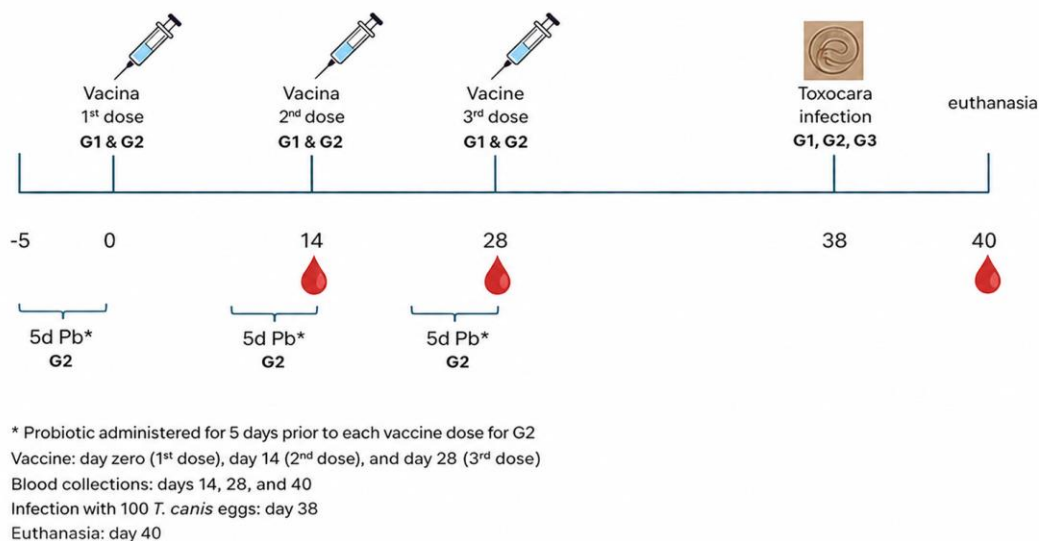
Considerando resultados anteriores que demonstraram que o sobrenadante livre de células (SLC) do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 possui ação imunoestimulante e larvicida contra *T. canis* (Walcher et al., 2018), este estudo avaliou se o uso deste SLC na suplementação dos animais promove uma melhor resposta vacinal. O probiótico *L. rhamnosus* ATCC 7469 foi cultivado em Man, Rogosa e Sharpe (MRS) caldo durante 48 h a 37 ° C com 5-10% de CO<sub>2</sub> (Moura et al., 2023; Cunha et al., 2024). Após o período de incubação a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 10 min e o SLC foi separado e armazenado a 4°C. Durante a produção do probiótico, o controle de qualidade, a viabilidade celular, a pureza da cultura e a padronização da concentração bacteriana foram conduzidos conforme a metodologia descrita por Walcher et al. (2018), na qual a viabilidade foi determinada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) mediante plaqueamento em ágar MRS ágar, seguido de incubação a 37 °C por 24–48 h em condições controladas de microaerofílicas. A pureza da cultura foi avaliada por análise morfológica das colônias e coloração de Gram, assegurando ausência de contaminantes, enquanto a concentração bacteriana foi padronizada com base na densidade óptica (OD<sub>600</sub>) e confirmada por contagem em placa. Adicionalmente, parâmetros como pH do meio e características macroscópicas da cultura foram acompanhados ao longo do cultivo, garantindo a reprodutibilidade e estabilidade do probiótico utilizado para obtenção do SLC.

#### 4.2.4 Delineamento Experimental

Foram utilizados 48 camundongos *Swiss*, entre fêmeas e machos, com 5 a 7 semanas de idade, divididos em quatro grupos. Os grupos foram distribuídos da seguinte forma: G1 (Vac+Tx): Vacina Vac-rTES30 + infecção com *T. canis*; G2 (SLC+Vac+Tx): SLC de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 + vacina Vac-rTES30 + infecção com *T. canis*, G3 (Tx): PBS + infecção com *T. canis*; G4 (Controle): PBS, os animais receberam apenas PBS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Medicina (FAMED-FURG) em mini-isoladores (Tecniplast) sob temperatura controlada 22 + 1°C e ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), tendo ração e água *ad libitum*. Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Rio Grande, sob parecer nº33, processo nº23116.003397/202-75.

Os camundongos dos grupos G1 e G2 foram inoculados com a vacina Vac-rTES30, por via subcutânea, em três doses de 50 µg, sendo a primeira dose no dia zero, a segunda dose no dia 14 e a terceira no dia 28. O G2 foi suplementado com SLC de *L. rhamnosus* ATCC 7469, no volume de 200 µL pela via intragástrica (IG), durante o período de cinco dias anteriores a cada dose vacinal. No G1 e G3 foi administrado PBS pela mesma via e mesmo período. Após 10 dias da 3ª dose vacinal (dia 38), os grupos G1, G2 e G3 foram infectados experimentalmente com 100 ovos embrionados de *T. canis* por via oral, através de sonda IG. Todos os animais foram submetidos à eutanásia no mesmo dia experimental, 2 dias após o desafio experimental com *T. canis* (dia 40).

O delineamento experimental G1(Vac+Tx), G2(SLC+Vac+Tx) e G3 (Tx) é representado na figura 1.



**Figura 1.** Linha do tempo mostrando a administração do SLC de *L. rhamnosus* ATCC 7469, a aplicação das três doses da vacina e a inoculação de *Toxocara canis* em camundongos Swiss.

#### 4.2.5 Avaliação da ação vacinal sobre a carga parasitária

Dois dias após a infecção experimental, os camundongos foram submetidos à eutanásia e tiveram os órgãos analisados. A avaliação nesse período de intervalo permite determinar se a vacina impediu a invasão inicial e disseminação tecidual dos parasitos. A fim de avaliar o efeito protetor da vacinação, a intensidade de infecção por larvas de *T. canis* foi determinada por processamento tecidual de órgãos (encéfalo, fígado e pulmões, coração, rins, musculatura, olhos) em solução de pepsina 1% e ácido clorídrico 1% a 37° C, conforme descrito por (Avila et al., 2012). O exame foi realizado em microscópio óptico, em aumento de 100 e 400 x.

#### 4.2.6 Investigação da cinética da produção de anticorpos

Nos dias 14, 28 e 40 foram realizadas coletas de sangue pela via submandibular para a obtenção de soro e pesquisa de anticorpos para *T. canis*. Para realizar a pesquisa da imunogenicidade da vacina Vac-rTES30, foi utilizado teste ELISA, conforme descrito por Santos et al. (2018).

Cada poço da placa de microtitulação de fundo plano de 96 poços (Nunc Immuno Maxisorp, Thermo Fischer Scientific, EUA) foi sensibilizada com 100 µL de antígeno

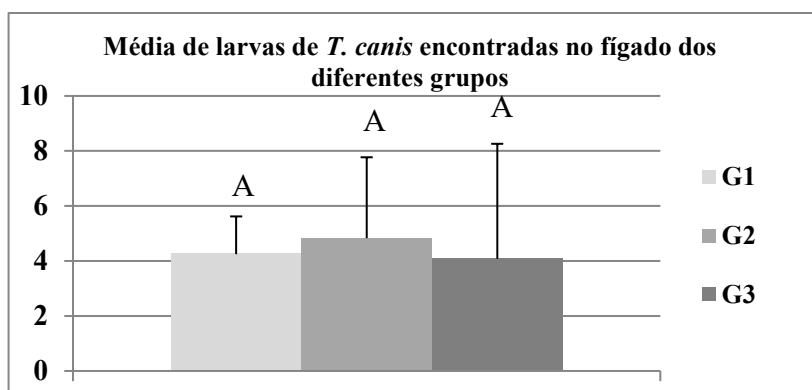
recombinante diluídos na concentração (100 ng) antígeno em tampão bicarbonato, pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C a noite. Após, foram lavadas com PBS-T, para remover o antígeno não adsorvido e bloqueadas com solução PBS-T contendo leite em pó a 5% (Nestlé®, Brasil) por 1 h a 37°C. Após nova etapa de lavagem, foram adicionadas amostras de soro (100 µL, 1: 150 em PBS-T, em duplicata) e as placas foram incubadas a 37°C por 1 h. Posteriormente as placas foram novamente lavadas com PBS-T e incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo IgG ligado à peroxidase (Sigma-Aldrich) a 37°C por 1 hora. Após a etapa final de lavagem adicionou-se o substrato de dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD; Sigma Aldrich), em tampão citrato pH 4,0 contendo peróxido de hidrogênio, e as placas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A reação foi avaliada por leitura das absorbâncias em espectrofotômetro a 450 nm. Como controle positivo foram usados soros de camundongos sabidamente positivos para *T. canis* e como controle negativos, animais livres de infecção (Santos et al., 2018).

#### 4.2.7 Análise estatística

Foi utilizada análise de variância (ANOVA) para presença de larvas da digestão tecidual seguida do Teste de Tukey, com nível de significância de 0,05 para comparação entre médias.

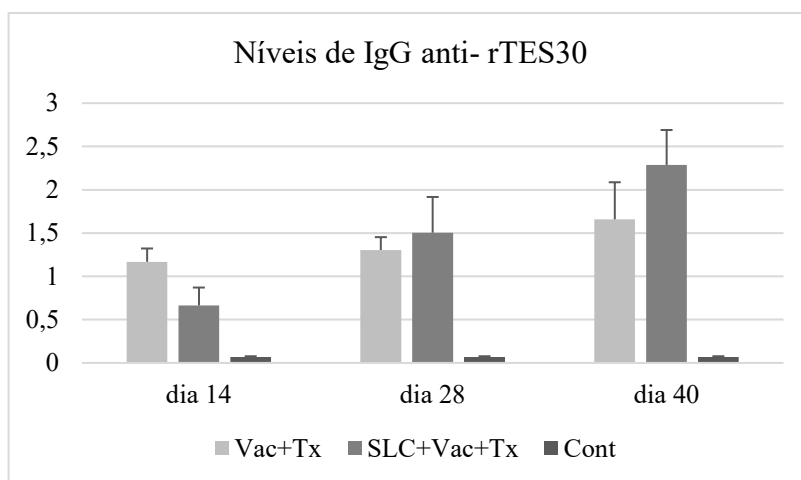
### 4.3 RESULTADOS

A avaliação da intensidade de infecção por *T. canis* foi avaliada por meio da técnica de processamento tecidual dos grupos G1, G2, G3, G4 após 48 horas da infecção com *T. canis*, sendo observada a presença de larvas de *T. canis* no fígado e pulmões dos grupos G1, G2 e G3 e ausência de larvas no G4 (Figura 2). Não foram observadas larvas no encéfalo, coração, rins, musculatura e olhos de nenhum dos animais dos diferentes grupos. Não foram observadas diferenças estatísticas quando comparados os grupos G1, G2 e G3 entre si, em relação à intensidade de infecção, indicando que tanto a imunização quanto a administração do SLC não foram capazes de promover a redução da infecção por *T. canis*. As médias do número de larvas de *Toxocara canis* recuperadas foram: 4,25 ± 1,38 (G1), 4,83 ± 2,95 (G2) e 4,08 ± 4,19 (G3) conforme (Figura 2).



**Figura 2.** Média do número de larvas de *Toxocara canis* recuperados no fígado de camundongos *Swiss* experimentalmente infectados que receberam: vacina rTES 30 (G1), suplementação com SLC de *L. rhamnosus* ATCC 7469 e vacina rTES 30 (G2), somente infectados com *T. canis* (G3), e G4 tratado com PBS controle Negativo sem infecção, sendo observado que não houve resultado estatisticamente significativo entre os grupos.

Na figura 3 é possível observar que o G1 (Vac+Tx), no 14º dia, exibiu valores de absorvância próximos a 1.0, indicando presença de resposta humoral. No dia 28, houve aumento da absorvância nos grupos vacinados, com valores majoritariamente entre 1.0 e 1.5, sugerindo intensificação da resposta imunológica após a segunda dose. No 40º dia, os níveis de anticorpos mantiveram-se elevados, com valores entre 1.5 e 2.5, indicando que a terceira dose reforçou substancialmente a resposta específica à rTES30. A avaliação da cinética de anticorpos indicou que não houve diferença significativa entre os grupos vacinados G1(Vac+Tx) e G2 (SLC+Vac+Tx) em todos os tempos avaliados (dias 14, 28 e 40), indicando que a suplementação com SLC não potencializou a resposta humoral induzida pela vacina. Entretanto, ambos os grupos apresentaram aumento significativo dos níveis de IgG ao longo do tempo, principalmente após a segunda e terceira dose. Além disso, quando comparados aos grupos não vacinados G3 (Tx) e G4 (Controle PBS), os grupos G1 e G2 apresentaram níveis de anticorpos significativamente elevados, enquanto os controles permaneceram com valores basais durante todo o período experimental, confirmando que a resposta humoral observada é decorrente da imunização com rTES30. O G4 (controle PBS), composto por animais não vacinados, manteve valores de absorvância próximos de zero ao longo do período experimental com ausência de anticorpos detectáveis pela técnica de ELISA.



**Figura 3.** Cinética da produção de anticorpos IgG em camundongos *Swiss* vacinados com rTES 30 e experimentalmente infectados por *T. canis* (Vac+Tx: G1 e SLC+Vac+Tx: G2) e não vacinados (Cont: G4 administração somente de PBS).

#### 4.4. DISCUSSÃO

Um dos primeiros estudos que avaliaram o efeito de uma vacina contra *T. canis* foi realizado por Dvorosnakova et al. (2002), no qual camundongos foram inoculados com TES nativo e posteriormente infectados com ovos do parasito, resultando em 40% de redução no número de larvas infectantes em modelo murino. A seguir, estudos foram realizados para avaliar e caracterizar as diferentes proteínas do TES nativo, sendo identificadas um total de 64 (Silva et al., 2018). A análise proteômica do TES revela um conjunto diversificado de proteínas, as quais estão envolvidas em mecanismos variados utilizados pelo parasito para interagir com o hospedeiro (Sperotto et al., 2017). Com base nesses estudos, uma série de proteínas foram identificadas como candidatas para serem usadas no diagnóstico e no desenvolvimento de vacinas. Dentre estas, recebe destaque a proteína TES-30 que, na sua forma recombinante, mostrou elevada sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da toxocaríase (Santos et al., 2018).

No presente estudo, foi avaliado o efeito protetor de uma vacina desenvolvida com a proteína rTES-30 de *Toxocara canis*. Embora a vacina rTES-30 tenha sido imunogênica, esta não foi protetora uma vez que não houve redução da intensidade de infecção por larva de *T. canis*. É importante destacar que o desenvolvimento de vacinas contra helmintos representa um desafio significativo uma vez que estes expressam sistemas complexos de modulação imunológica por meio de moléculas anti-inflamatórias capazes de suprimir vias efetoras do hospedeiro (Hewitson e Maizels 2009; Jaramillo-Hernandez et al., 2020; Zawawi e Else 2020).

No presente estudo, apesar de terem sido observados níveis elevados de IgG nos dois grupos vacinados, com médias de densidade óptica de 1,044 e 1,326, para G1 e G2, respectivamente, estes anticorpos gerados podem não ter sido neutralizantes ou capazes de interferir na invasão e migração de larvas. A literatura ressalta que, apesar da indução de anticorpos específicos, isoladamente, níveis aumentados de IgG não são um marcador de proteção contra infecção por *T. canis* (Despommier, 2003, Maizels, 2013). Hotez et al. (2010) e Loukas et.al. (2016), observaram que as respostas protetoras contra helmintos estão associadas a um perfil celular de resposta imune adaptativa do tipo Th2, caracterizado pela produção de citocinas como IL-4, IL-5, e IL-13, que promovem a produção de IgE, eosinofilia e ativação de macrófagos alternativamente ativados. Vacca e Le Gross, (2022) também destacam que os helmintos são capazes de induzir respostas humorais intensas concomitante a ativação de vias regulatórias do sistema imune, incluindo expansão de células T reguladoras com produção de IL-10, TGF- $\beta$  e modulação da função de células apresentadoras de antígenos. Esse mecanismo permite que o hospedeiro produza anticorpos detectáveis por ensaios sorológicos, sem que ocorra a eliminação do parasito. Este contexto é aplicável aos resultados do presente estudo nos quais os grupos G1 e G2 apresentaram níveis de anticorpos elevados enquanto os grupos controles permaneceram negativos reforçando a imunogenicidade da vacina, mas não necessariamente sua proteção.

A escolha pela proteína rTES-30 para o desenvolvimento desta vacina foi baseada na sua elevada capacidade antigênica, conforme observado nos testes de imunodiagnóstico de Santos et al., (2018). No estudo de Jaramillo-Hernandez et al., (2020) foi observado que vacina desenvolvida com a proteína rTcVcan, derivada de antígeno de *T. canis* associados ao adjuvante Quil-A®, promoveu redução inferior a 50% das larvas de *T. canis* em camundongos C57BL/6. Enquanto a proteína rTCVCad, sob as mesmas condições, promoveu 25-30% de redução. A discrepância entre esses resultados indica que diferenças estruturais e funcionais entre antígenos influenciam diretamente a capacidade dessas proteínas de ativar mecanismos efetores da imunidade, como respostas Th2 balanceadas, produção de anticorpos funcionalmente relevantes e ativação de células efetoras. Neste contexto, a ausência de proteção observada com a rTES30 sugere que mesmo a proteína sendo imunogênica, não foi capaz de desencadear uma resposta protetora nas condições avaliadas. Uma explicação para esse resultado reside na limitação antigênica, sugerindo que a proteína rTES30, usada de forma isolada, possa não conter epítomos envolvidos no bloqueio da invasão ou migração tecidual de *T. canis*, uma vez

que uma porção de antígeno específico é fundamental para desencadear uma resposta protetora (Maizels et al. 2018). Nesse sentido, estratégias baseadas em múltiplos antígenos ou proteínas multivalentes tendem a ser mais eficazes, conforme sugerido por Jaramillo-Hernandez et al., (2020), reforçando a hipótese de que a rTES30, quando utilizada como antígeno único possui potência imunológica limitada.

Outro aspecto importante é o tipo de adjuvante vacinal utilizado. No estudo de Jaramillo-Hernandez et al., (2020), que avaliaram vacinas produzidas com outras proteínas recombinantes de *T. canis*, a utilização de adjuvante completo/incompleto de Freund induziram resposta imunogênica detectável, no entanto não foi observada uma redução significativa da carga parasitária. Entretanto, o uso do adjuvante hidróxido de alumínio associado ao Quil A<sup>®</sup> apresentou melhor desempenho, resultando em maior redução de carga parasitária ( $\approx 30-40\%$ ). De forma semelhante, os achados de Natukunda et. al. (2022) contribuem para a compreensão na interpretação dos mecanismos de falha ou sucesso de vacinas contra helmintos, especialmente no que se refere à escolha e combinação de adjuvantes. Adjuvantes como Quil A<sup>®</sup> (saponina) associado com hidróxido de alumínio induziram respostas mais balanceadas (Th1/Th2), enquanto hidróxido de alumínio isolado resultam em resposta Th2 com menor efeito protetor. Quanto aos valores, os estudos desse autor apresentaram maior redução da carga parasitária na faixa de ( $\approx 20-45\%$ ) com melhor desempenho quando associado antígeno-adjuvante.

Revisões sobre vacinas recombinantes para helmintos transmitidos pelo solo (STH) confirmam que o quanto é difícil a indução de imunidade protetora (Diemert, Bethony e Hotez, 2008; Hotez et al., 2011; Loukas et al., 2016). No estudo de Ortega et al., (2024) foi verificada uma prevenção moderada de *Teladorsagia circumcincta*, mesmo com um modelo experimental mais próximo do natural, reforçando que helmintos possuem mecanismo potentes de evasão imunológica. Estudo que avaliou o desenvolvimento de vacina a partir de proteínas de excreção e secreção *Haemonchus contortus* comprovou uma proteção apenas parcial, apesar da elevada produção de anticorpos (Bakker et al., 2004). Assim, embora em contextos e sistemas experimentais distintos, ambos os autores convergem ao evidenciar que a imunidade induzida por antígenos de helmintos é parcial e que a complexidade da interação parasito-hospedeiro representa um dos principais entraves para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes.

A ausência de proteção observada pela rTES30 no presente estudo pode refletir um fenômeno comum as vacinas anti-helmínticas; anticorpos são produzidos, mas não

são suficientes para neutralizar mecanismos sofisticados de evasão imunológico característico de nematódeos. A imunidade contra *T. canis* depende de fatores combinados, envolvendo respostas celulares e humorais que são capazes de ativar de forma suficiente o sistema imune do hospedeiro contribuindo, para controlar a migração de larvas e neutralizar a infecção (De Oliveira et al., 2019; Borchard et al., 2022). Assim, proteínas isoladas são mais propensas a falhar na indução de uma resposta imune robusta, enquanto vacinas mais eficazes, normalmente, combinam múltiplos antígenos e utilizam plataformas que são capazes de aumentar a ativação de células efetoras (Nisbet et al., 2013; Xiong et al., 2023).

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a imunização com a proteína rTES30 foi capaz de induzir a resposta humoral específica, evidenciada pela produção de anticorpos IgG, no entanto, essa resposta não se refletiu na redução de carga larval, nem na prevenção do estabelecimento da infecção por *Toxocara canis* em modelo murino. Nas condições avaliadas, tanto a vacinação quanto a suplementação com SLC não foram suficientes para promover proteção efetiva. Em conjunto, esses achados reforçam a complexidade da resposta imune envolvida na toxocaríase e evidenciam que a indução isolada de anticorpos não garante controle da infecção, ressaltando a necessidade de estratégias vacinais mais abrangentes, como o uso de múltiplos antígenos, adjuvantes mais eficazes e abordagens capazes de induzir respostas imunes integradas em estudos futuros.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA, L.F.C., et al., 2012. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocaríasis. *Vet. Parasitol.* 187, 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.002>
- BAKKER, V.V., et al., 2004. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine*, 22, n. 5-6, p 618–628. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.09.026>
- BONILLA-ALDANA, D. K. et al. Prevalence of parasite eggs in Latin American parks: a systematic review and meta-analysis. *Infectio*, n. 3, p. 329–349, 2023. DOI: <https://doi.org/10.53854/liim-3103-7>
- BORCHARD, J.L., et al., 2022. Immunomodulatory response to *Toxocara canis*. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 31. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612022089>

- DESPOMMIER, D., et al., 2003. Toxocariasis: clinical aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
- DVOROZNAKOVA, et al., 2002. Immune responses in mice immunized with *Toxocara canis* antigens *Helminthologia*, v.39, n.2, p.59-66, 2002.
- DE OLIVEIRA, V.C., et al., 2019. Immune response to chronic toxocariasis. *Parasite Immunol.* <https://doi.org/10.1111/pim.12650>
- DIEMERT, D.J., Bethony, J.M., Hotez, P.J., 2008. Hookworm vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 7, 823–830. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.6.823>
- HEWITSON, J.P., Maizels, R.M., 2009. Helminth immunoregulation: the worm's way of survival. *Immunology*, v. 129, n. 4, p. 477–486.2009 <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- HOTEZ, P.J et al., 2010. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology* 8 (11), 814–826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2438>
- HOTEZ, P.J., et al., 2011. Development of vaccines for neglected tropical diseases: a roadmap. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 487–498. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2570>
- HOTEZ, P.J., et al., 2008. Helminth infections. *J. Clin. Invest.* 118, 1311–1321. <https://doi.org/10.1172/JCI34261>
- HONG, S. H. Influence of microbiota on vaccine effectiveness: is the microbiota the key to vaccine-induced responses? *Journal of Microbiology*, v. 61, n. 6, p. 483–494, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00044-6>
- JARAMILLO-HERNÁNDEZ, D.A., et al., 2020. Toxocariasis y vacunación para *Toxocara*: una revisión sistemática. *Orinoquia*, v. 24, n. 2, p. 79-95, <http://dx.doi.org/10.22579/20112629.631>.
- LOPEZ-ALAMILLO, S., et al., 2025. Human toxocariasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 38, e00101-23. <https://doi.org/10.1128/cmr.00101-23>
- LOUKAS, A et al.; 2016 Hookworm infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, art. 16088. Doi: 10.1038/nrdp.2016.88
- MAIZELS, Rick M., 2013. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*, v. 193, n. 4, p. 365–374. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.12.032.
- MAIZELS, R.M., et al., 2018. Regulation of the host immune system by helminth parasites: the expanding repertoire of parasite effector molecules. *Immunity* 49, 801–818. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.016>

- MOURA, M.Q., et al., 2023. Immunomodulation in the intestinal mucosa of mice supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) and infected with *Toxocara canis*. *Immunobiology*, v. 228, p. 152359. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152359>
- NATUKUNDA, K., et al., 2022. The effect of helminth infection on vaccine responses in humans and animal models: a systematic review and meta-analysis. *Parasite Immunol.* 44, e12939. <https://doi.org/10.1111/pim.12939>
- NISBET, A.J., et al., 2013. Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine* 31, 4017–4023. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.026>
- ORTEGA, S., et al., 2024. Analysis of protection and immune response against *Teladorsagia circumcincta* in goats immunised with thiol-binding proteins from adult worms. *Vaccines* 12, 437. <https://doi.org/10.3390/vaccines12040437>
- ROSTAMI, A., et al., 2019. Global seroprevalence of toxocariasis in humans: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007809. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007809>
- SANTOS, L.M.D., et al., 2018. Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. *Parasite Immunology* 40 (8), e12568. <https://doi.org/10.1111/pim.12568>.
- SANTOS, L.L., et al., 2021. Production and evaluation of recombinant TES-30 antigen for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research* 120 (5), 1681–1690.
- SEGERS, M.E., Lebeer, S., 2014. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG–host interactions. *Microb. Cell Fact.* 13, S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- SILVA, M. B et al., 2018. Somatic proteins of *Toxocara canis* larvae and excretory-secretory products revealed by proteomics. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.015>
- SILVA, M.B., et al., 2022. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of infection by *Toxocara* spp. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.14650>
- SPEROTTO L. R. et al., 2017 Proteomic analysis of excretory-secretory (TES) proteins of *Toxocara canis*. *Molecular-and-Biochemical - Parasitology*, v.211, p.39-47. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>

- VACCA, F., Le Gros, G., 2022. Tissue-specific immunity in helminth infections. *Mucosal Immunol.* 15, 1212–1223. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00531-w>
- WALCHER, D. L. et al. 2018. *Lactobacillus rhamnosus* reduces parasite load in experimental *Toxocara canis* infection in mice but has no effect in vitro. **Parasitology Research**, Berlin, v. 117, n. 2, p. 597–602, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5712-7>
- WALCHER, D. L. et al. 2023. Larvicide activity of *Lactobacillus* spp. and *Saccharomyces boulardii* supernatants on *Toxocara canis*. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 109, n. 1, p. 55–61, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1645/20-161>
- WANGCHUCK, P. et al., 2020. Excretory/secretory metabolome of the zoonotic roundworm *Toxocara*. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, 1157. DOI: 10.3390/biom10081157.
- XIONG, Z., et al., 2023. Evaluation of the immunoprotective effects of eight recombinant proteins from *Baylisascaris schroederi* in a mouse model. *Parasites Vectors* 16, 254. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05886-y>
- XU, J., Han, Q., 2024. Prevalence, infection and risk to humans of *Toxocara canis* in domestic environments and food-producing animals. *Vet. Sci.* 11, 83. <https://doi.org/10.3390/vetsci11020083>
- ZAWAWI, A., Else, K.J., 2020. Vaccines against soil-transmitted helminths: are we getting closer? *Front. Immunol.* 11, 576748. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.576748>

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, não existem estudos demonstrando a proteção vacinal efetiva com rTES30 de forma isolada. Embora a rTES30 tenha falhado como candidata vacinal nas condições testadas ela foi bem-sucedida em induzir anticorpos específicos evidenciando sua imunogenicidade. Os resultados obtidos fornecem contribuições importantes para a compreensão da resposta imunológica induzidas por antígenos recombinantes de *T. canis*, especialmente ao demonstrar que a indução da resposta humoral isolada não se traduz necessariamente em proteção contra infecção. Nesse sentido, este estudo reforça limitações já descritas para vacinas baseadas em antígenos únicos e destaca a complexidade da interação parasito- hospedeiro, Assim, os achados aqui apresentados neste estudo fornece contribuições relevantes para o aprimoramento de estratégias vacinais e destaca a necessidade de investigações futuras que evidenciem estratégias robustas com combinações de múltiplos antígenos e adjuvantes potentes capazes de induzir respostas celulares e humorais eficientes, afim de promover proteção mais consistente contra a toxocaríase.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, v. 75, p. 105–114, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>
- ARDURA-GARCIA, C., Curtis, N., Zimmermann, P., 2024. Systematic review of the impact of intestinal microbiota on vaccine responses. *npj Vaccines* 9, 254. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-01000-0>
- AL-AWADHI, M.; JAMAL, W. Seroprevalence of toxocariasis among allergic patients in Kuwait and its association with eosinophilia. *Parasite Epidemiology and Control*, v. 18, e00260, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00260>
- AVILA, L. F. C. et al. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, v. 187, n. 1–2, p. 337–340, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.002>
- AVILA, L. F. C. et al. Modulation of IL-12 and IFN- $\gamma$  by probiotic supplementation promotes protection against *Toxocara canis* infection in mice. *Parasite Immunology*, v. 38, n. 5, p. 326–330, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12314>
- BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G. et al. From probiotics to postbiotics: concepts and health effects. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, p. 605–616, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0170-4>
- BONILLA-ALDANA, D. K. et al. Prevalence of parasite eggs in Latin American parks: a systematic review and meta-analysis. *Infectio*, n. 3, p. 329–349, 2023. DOI: <https://doi.org/10.53854/liim-3103-7>
- BOTTAZZI, M.E., Hotez, P.J., 2019. Challenges in NTD vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 15, 2235–2242. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1615955>
- BOWMAN, D.D. History of *Toxocara* and the associated larva migrans. *Advances in Parasitology*, v. 109, p. 17–38, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.037>
- BRON, P.A., et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *British Journal of Nutrition*, v. 117, n. 1, p. 93–107, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114516004037>
- CADORE, P, S, et al. Protective effect of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in BALB/c mice infected with *Toxocara Canis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.63, e09, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163009>

- COX, D.M., HOLLAND, C.V. Influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. *Journal of Helminthology*, v. 75, p. 23–32, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1079/JOH200027>
- CUNHA, C.N.O., et al. The larvicidal effect of the supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology*, v. 258, p. 108720, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2024.108720>
- CHAN, Y.K.; GACK, M.U., Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nature Reviews Microbiology* 14, 360–373. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.45>
- CHEN, J. et al. Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infectious Diseases of Poverty*, v. 7, art. 59, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>
- DALTON, J. P.; et al. Designing adult vaccines for parasitic helminths: challenges and opportunities. *Science Translational Medicine*, v. 5, n. 162, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005399>
- DESPOMMIER, D., et al., 2003. Toxocariasis: clinical aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 265–272. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.265-272.2003>
- DVOROZNAKOVA, E., et al. Immune responses in mice immunized with *Toxocara canis* antigens. *Helminthologia*, v. 39, n. 2, p. 59–66, 2002.
- DŁUGOSZ E.; BASAŁAJ K.; ZAWISTOWSKA-DENIZIAK A. Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on *Toxocara canis* glycans. *Parasitol Res.* n.118, v.10, p.2925-2933, 2019
- FAN, C.K et al. 2015. A. Human toxocariasis and ocular involvement. *Acta Tropica*, v. 141, p. 45–52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.09.007>
- FAKHRI, Y., GHASSEMIAN, M., ROSTAMI, A., et al. Seroprevalence of *Toxocara* infection in the world: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 10, e0006876, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006876>
- FILLAUX, J., MAGNAVAL, J.F. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, v. 193, n. 4, p. 327–336, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028>
- FINSTERER, J.; AUER, H. Neurotoxocarosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 49, n. 5, p. 279–287, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000500001>

- FU, C.-J., et al. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 261, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-261>
- GARCÉS, L.F.S., et al. Immunogenicity and protection induced by recombinant *Toxocara canis* proteins in a murine model of toxocariasis. *Vaccine*, v. 38, n. 30, p. 4762–4772, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.04.072>
- GAUCI, C.G., et al. Protection against cystic echinococcosis in sheep using an *Escherichia coli*-expressed recombinant antigen (EG95) as a bacterin. *Parasitology*, v. 150, n. 1, p. 29–31, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182022001457>
- GASSER, R. B. et al. Harnessing the *Toxocara* genome to underpin toxocariasis research and new interventions. *Advances in Parasitology*, v. 91, p. 87–110, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2015.12.001>
- HAN, S. H. Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, v. 6, art. 421, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00421>
- HASAN, Md. et al. Reverse vaccinology approaches for multi-epitope vaccine design: a comprehensive review. *Microorganisms*, v. 12, n. 7, p. 1270, 2024.
- HEATH, D.D., et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology*, v. 34, n. 5, p. 296–303, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01364.x>
- HEWITSON, J.P., Maizels, R.M. Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Review of Vaccines*, v. 13, n. 4, p. 473–487, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.893195>
- HEWITSON, J.P et al., 2009. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 167, n. 1, p. 1–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- HILL, C. et al., 2014. Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 11, n. 8, p. 506–514. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- HONG, S. H. Influence of microbiota on vaccine effectiveness: is the microbiota the key to vaccine-induced responses? *Journal of Microbiology*, v. 61, n. 6, p. 483–494, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-023-00044-6>

HOTEZ, P. J. et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1311–1321, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI34261>

HOTEZ, Peter J.; WILKINS, Patricia P. Toxocariasis: America's most common neglected infection of poverty and a helminthiasis of global importance? Public Library of Science *PLoS Neglected Tropical Diseases*, San Francisco, v. 3, n. 3, p. e400, 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000400

HOTEZ, P. J et al., 2010. Developing vaccines to combat hookworm infection and intestinal schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 11, p. 814–826. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2438>

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

INIĆ-KANADA, A.; STANISAVLJEVIĆ, S.; MIJATOVIĆ, S.; et al. Lactobacillus rhamnosus as a novel adjuvant for enhancing humoral and cellular immune responses to a chlamydial vaccine in BALB/c mice. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p. 45–56, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.02.024>

JACQUIER, P., GOTTSTEIN, B., STARKLOFF, G., ECKERT, J. Immunodiagnosis of toxocariasis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 9, p. 1831–1835, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.29.9.1831-1835.1991>

JARAMILLO-HERNÁNDEZ, D.A., et al. Protective response mediated by immunization with recombinant proteins in a murine model of toxocariasis and canine infection by *Toxocara canis*. *Vaccine*, v. 40, n. 6, p. 912–923, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.12.052>

JARAMILLO-HERNÁNDEZ, D.A., et al. Toxocariasis y vacunación para *Toxocara*: una revisión sistemática. *Orinoquia*, v. 24, n. 2, p. 79–95, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22579/20112629.631>

KAUR, H., Ali, S. Probiotics and their interaction with toll-like receptors: a mechanistic insight into immune modulation. *Food & Function*, v. 13, n. 18, p. 9470–9485, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/D2FO00911K>

LARANJEIRA, P.C. Probióticos – revisão bibliográfica e perspectivas futuras. 2020. 48 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde,

Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2020. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/9315>. Acesso em: 16 abr. 2025.

LEAL-SILVA, T. et al. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and immunopathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.86991>.

LEAL-SILVA, T., et al. Immune response in human toxocariasis: a systematic review. *Parasite Immunology*, v. 43, n. 6, e12818, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12818>

LEKKI-JÓŹWIAK, J., Baška, P. The roles of various immune cell populations in immune response against helminths. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 1, p. 420, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25010420>

LYNN, D. J. et al. Modulation of immune responses to vaccination by the microbiota: implications and potential mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, v. 22, p. 33–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00554-7>

LIGHTOWLERS, M.W., et al. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitology Today*, v. 19, n. 6, p. 256–261, 2003.

LOUKAS, A., et al. Hookworm infection. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, art. 16088, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.88>

LOPEZ-ALAMILLO, S., Padyala, P., Carey, M., Duffey, M.M., Weatherhead, J.E. Human toxocariasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 38, n. 3, e00101-23, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00101-23>

LUNA, E.J.A., Campos, S.R.S.L.C. O desenvolvimento de vacinas contra as doenças tropicais negligenciadas. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 36, supl. 2, e00215720, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00215720>

MA, G. et al. Human toxocariasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. e14–e24, 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)

MAIZELS, R.M., MCSORLEY, H.J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 138, n. 3, p. 666–675, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.007>

MAIZELS, R.M. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *Journal of Biology*, v. 8, n. 7, p. 62, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/jbiol161>

MAGNAVAL, J.-F., GLICKMAN, L.T., Dorchies, P., Morassin, B. Highlights of human toxocariasis. *Korean Journal of Parasitology*, v. 39, n. 1, p. 1–11, 2001. DOI: <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>

- MAGNAVAL, J.-F.; BOUHSIRA, E.; Fillaux, J. Therapy and prevention for human toxocariasis. *Microorganisms*, v. 10, n. 2, art. 241, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020241>
- MAZUR-MELEWSKA, K. et al. Toxocariasis in children: poor hygiene habits and contact with dogs is related to longer treatment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 27, n. 1, p. 119–123, 2020. DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/108707>
- MARKOWIAK, P., ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- MARTY-ROIX, R., et al. Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, p. 1123–1136, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683011>
- MILLER, J. E.; Horohov, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 139, p. 3–13, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.048>
- MOURA, M.Q., et al. Immunomodulation in the intestinal mucosa of mice supplemented with *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469) and infected with *Toxocara canis*. *Immunobiology*, v. 228, p. 152359, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2023.152359>
- MOHAMAD S.; AZMI N.C.; NOORDIN R. Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocariasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120). *J Clin Microbiol.* v. 47, n; 6, p. :1712 1717, 2009.
- NICOLETTI, A. Toxocariasis and neurological disorders. *Neurological Sciences*, Milan, v. 41, n. 5, p. 1031–1035, 2020. DOI: 10.1007/s10072-020-04243-6
- NOON, J.B., AROIAN, R.V. Recombinant subunit vaccines for soil-transmitted helminths. *Parasitology*, v. 144, n. 14, p. 1845–1870, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/S003118201700138X>
- NIJSSE, R., et al. Prevalence and risk factors for patent *Toxocara* infections in cats and cat owners' attitude towards deworming. *Parasitology Research*, v. 115, p. 19–25, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5242-8>

- NOORDIN, R. et al. Serodiagnostic methods for diagnosing larval toxocariasis. *Advances in Parasitology*, v. 109, p. 131–152, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.003>
- O'TOOLE, P.W., COAKLEY, M., ROSS, R.P. The influence of the gut microbiota on host health: an overview. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 23, n. 9, p. 575–583, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.04.006>
- OTERO, D., et al. Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*, v. 11, p. 94–98, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.05.002>
- PLAZA-DÍAZ, J. et al. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, v. 10, supl. 1, p. S49–S66, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- PARREÑO, V., et al. Probiotic as adjuvant significantly improves protection of the Lanzhou trivalent rotavirus vaccine against heterologous challenge in a gnotobiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Vaccines*, v. 10, n. 9, art. 1529, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/vaccines10091529>
- RAMANAN, D.; BOWCUTT, R.; LEE, S. C.; et al. Helminth infection promotes colonization resistance via type 2 immunity. *Science*, v. 352, n. 6285, p. 608–612, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf3229>
- RAISSI, V., et al. Spatial analysis of *Toxocara* spp. eggs in soil as a potential risk for human infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 75, p. 101619, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101619>
- RAPPUOLI, Rino. Reverse vaccinology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 3, n. 5, p. 445–450, 2000.
- REYNOLDS, L. A. et al. Commensal–pathogen interactions in the intestinal tract: lactobacilli and helminths. *Trends in Parasitology*, v. 30, n. 6, p. 279–289, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.005>
- ROLDÁN, W. H. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human toxocariasis. *Parasite Immunology*, v. 37, p. 557–567, 2015. DOI: 10.1111/pim.12248.
- ROLDÁN, W. H. et al. Immunoglobulin M antibodies are not specific for serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunology*, v. 39, n. 8, e12447, 2017. DOI: 10.1111/pim.12447.

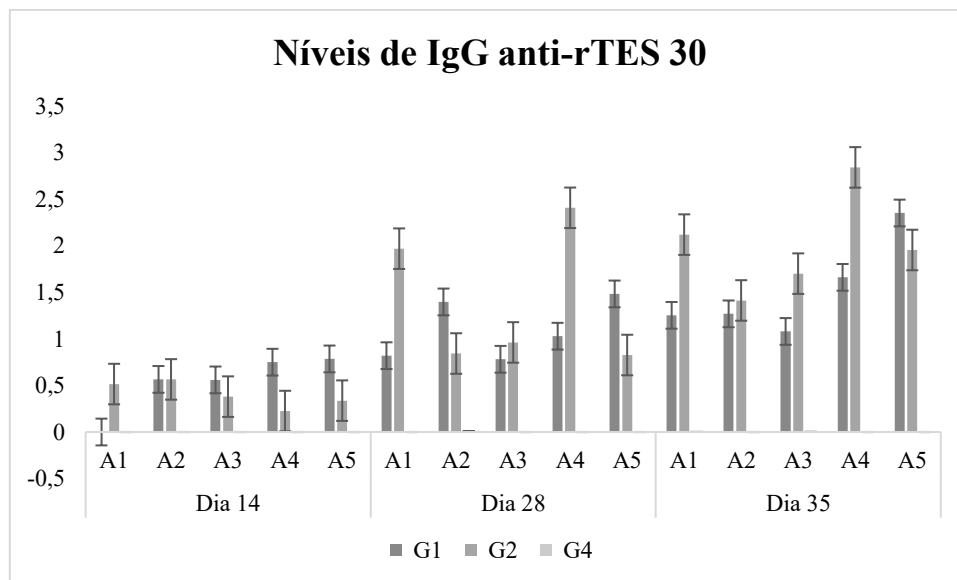
- ROSTAMI, A. et al. Global prevalence of toxocariasis in dogs: a systematic review and meta-analysis. *Advances in Parasitology*, v. 109, p. 561–583, 2020. DOI: 10.1016/bs.apar.2020.02.002.
- ROSTAMI, A. et al. Human toxocariasis: a look at a neglected disease through an epidemiological prism. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 74, 104002, 2019. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104002.
- RUBINSKY-ELEFANT, G., et al., 2010. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 104, 3–23. <https://doi.org/10.1179/136485910X12607012373957>
- SANTOS, F. D. S. et al. *Bacillus toyonensis* BCT-7112T spores as parenteral adjuvant of BoHV-5 vaccine in a murine model. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 13, n. 3, p. 655–663, 2021. DOI: 10.1007/s12602-021-09753-z
- SALMINEN, S. et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 18, p. 649–667, 2021. DOI: 10.1038/s41575-021-00440-6
- SANDERS, M. E.; Mundt, H. C.; Tannock, G. W.; et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, p. 605–616, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- SANTOS, L. M. D. et al. Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*, v. 40, n. 8, e12568, 2018. DOI: 10.1111/pim.12568.
- SANTOS, L. L. et al. Production and evaluation of recombinant TES-30 antigen for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research*, v. 120, n. 5, p. 1681–1690, 2021.
- SANTOS, L. M. D. et al. Reactivity of recombinant *Toxocara canis* TES-30/120 in experimentally infected mice. *Parasite Immunology*, v. 40, n. 8, e12568, 2018. DOI: 10.1111/pim.12568.
- SANTOS, J. P.; et al. Evaluation of recombinant TES-30 and TES-120 antigens for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research*, v. 117, n. 7, p. 2219–2227, 2018. DOI: 10.1007/s00436-018-5900-8.

- SHI, L. H. et al. Probiotic metabolites and their immunomodulatory effects on host immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 569551, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.569551>
- SILVA, M. B et al. Somatic proteins of *Toxocara canis* larvae and excretory-secretory products revealed by proteomics. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.015>
- SILVA, M.B. et al. Proteomics and immunoblotting analyses reveal antigens that optimize the immunodiagnosis of the infection by *Toxocara* spp. *Transboundary and Emerging Disease*, v.69, n.5, p. e2994- e3006, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.14650>
- SKULINOVÁ, K. et al. Antigenic Proteins from the Excretory–Secretory Products of *Toxocara canis* Larvae and Evaluation of Their Potential for Immunodiagnosics of Larval Toxocarosis. *Acta Parasitologica*, v. 67, n. 2, p. 705-713, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11686-021-00485-2>.
- SPEROTTO L. R. et al. Proteomic analysis of excretory-secretory (TES) proteins of *Toxocara canis*. *Molecular-and-Biochemical - Parasitology*, v.211, p.39-47, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.09.002>
- SMITH, W. D. et al. Protective immunity and vaccine development against gastrointestinal nematodes of ruminants. *Parasite Immunology*, v. 35, n. 9-10, p. 293–301, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/pim.12063>
- TIAN, X. et al. *Haemonchus contortus* transthyretin domain - containing protein (HcTTR): a promising vaccine candidate against *haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*, v.279, n.1, p.18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109045>.
- TANEJA, Neha et al. Reverse vaccinology and computational vaccine design: current trends and future perspectives. *Frontiers in Immunology*, v. 16, 2025.
- TAYLOR, M. R. H. et al. The expanded spectrum of toxocaral disease. *The Lancet*, v. 357, n. 9257, p. 1339–1340, 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)04523-7.
- VILANOVA, M. Vacinas e imunidade. *Revista de Ciência Elementar*, v. 8, n. 2, 021, 2020. DOI: 10.24927/rce2020.021.
- VACCA, F.; Le Gros, G. Tissue-specific immunity in helminth infections. *Mucosal Immunology*, v. 15, n. 6, p. 1212–1223, 2022. DOI: 10.1038/s41385-022-00531-w.

- WALCHER, D. L. et al. *Lactobacillus rhamnosus* reduces parasite load in experimental *Toxocara canis* infection in mice but has no effect in vitro. *Parasitology Research*, v. 117, p. 597–602, 2018. DOI: 10.1007/s00436-017-5712-7.
- WANGCHUCK, P. et al. Excretory/secretory metabolome of the zoonotic roundworm *Toxocara*. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, 1157, 2020. DOI: 10.3390/biom10081157.
- WEGH, C. A. M. et al. The role of short-chain fatty acids in host immune regulation and microbial cross-talk. *Gut Microbes*, v. 10, n. 5, p. 1–14, 2019. DOI: 10.1080/19490976.2019.1574923.
- WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization, 2020
- WHO. *How do vaccines work?* [Como funcionam as vacinas]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/how-do-vaccines-work>. Acesso em: 12 mar. 2025.
- XU, J.; HAN, Q. Prevalence, infection, and risk to humans of *Toxocara canis* in domestic and food-producing animals. *Veterinary Sciences*, v. 11, n. 2, 83, 2024. DOI: 10.3390/vetsci11020083.
- YAMASAKI, H. et al. Development of a highly specific recombinant antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology International*, v. 49, n. 1, p. 37–44, 2000. DOI: 10.1016/S1383-5769(99)00044-6.
- ZAHABIUN, F. et al. Production of *Toxocara cati* TES-120 recombinant antigen and comparison with its *T. canis* homolog for serodiagnosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 93, n. 2, p. 319–325, 2015. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0190.
- ZAWAWI, A.; ELSE, K. J. Soil-transmitted helminth vaccines: are we getting closer? *Frontiers in Immunology*, v. 11, 576748, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.576748.
- ZHENG, D. et al. Probiotics regulate intestinal immune responses and barrier function: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, v. 14, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1196845.

## 7. APÊNDICE I

A análise individual da produção de anticorpos IgG de acordo com o tempo de coleta de sangue nos dias 14, 28 e 35 dos grupos G1 (Vac +Tx), G2 (SLC+Vac+Tx) e G4 (Controle negativo-PBS) estão representados na figura.



**Figura 4.** Análise individual em diferentes tempos de coleta da quantificação de anticorpos IgG de acordo com os grupos: G1 vacina rTES30, G2 vacina rTES30 e suplementação com SLC de *L. rhamnosus* ATCC 7469 e o controle negativo -PBS- (G4)

## 8- ANEXO I

Documento aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Federal de Rio Grande, Comissão De Ética Em Uso Animal (CEUA) sob parecer nº33, processo nº23116.003397/202-75

30/08/2024, 14:07

SEI/FURG - 0267566 - Parecer



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
PROPEP - COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL



PARECER N° 103, DE 29 DE AGOSTO DE 2024

PROCESSO Nº	23116.003397/2024-75
CEUA Nº	Pq 011/2022
COLABORADORES AUTORIZADOS A MANIPULAR OS ANIMAIS	Livia Silveira Munhoz; Marcia Feltrin Dias de Souza; Lourdes Helena Rodrigues Martins
TÍTULO DO PROJETO	Avaliação do efeito de uma vacina com proteínas recombinantes para a prevenção da infecção por <i>Toxocara canis</i> em modelo murino
VIGÊNCIA DO PROJETO	30/06/2025
ESPÉCIE/ LINHAGEM / RAÇA	<i>Mus musculus</i> (Swiss)
NÚMERO DE ANIMAIS	120
PESQUISA	25-30g / 5-7 semanas
SEXO	Indiferente
ORIGEM	Biotério Central da UFSM, Prédio 98B. Av. Roraima nº 1000 - Bairro Camobi, Santa Maria/RS. CEP: 97105-900
ENVIO DO RELATÓRIO PARCIAL	Janeiro de 2025
ENVIO DO RELATÓRIO FINAL	Julho de 2025

30/08/2024, 14:07

SEI/FURG - 0267599 - Parecer

RESPONSÁVEL	Luciana Farias da Costa Avila
-------------	-------------------------------

**PARECER DA CEUA:**

Após a análise de sua solicitação de alteração de protocolo experimental, enviada a essa comissão em 20 de agosto de 2024, a CEUA-FURG **AUTORIZA** a alteração da utilização da linhagem dos 60 camundongos BALB/c para Swiss de sexo indiferente e a procedência dos animais, do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CEMBE) da PUC-RS, Porto Alegre, para o Biotério Central da UFSM, conforme protocolo descrito na solicitação apresentada.



Documento assinado eletronicamente por **Marcio de Azevedo Figueiredo, Servidor**, em 29/08/2024, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade do documento pode ser conferida no site [https://sei.furg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&acao\\_origem=documento\\_conferir&lang=pt\\_BR&id\\_organ\\_acesso\\_externo=0](https://sei.furg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&acao_origem=documento_conferir&lang=pt_BR&id_organ_acesso_externo=0) informando o código verificador **0267599** e o código CRC **FB345E45**.

Referência: Caso responda este documento Parecer, indicar o Processo nº 23116.003397/2024-75

SEI nº 0267599

## 9. ANEXO II

### COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA:

Você já ouviu falar em toxocaríase? Embora pouco conhecida pela população, essa é uma doença parasitária considerada negligenciada e com importante impacto na saúde pública. Ela é causada principalmente pelo nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães, e a infecção humana pode ocorrer de forma acidental pela ingestão de ovos e larvas do parasito presentes em solo, água ou alimentos contaminados, respectivamente. Após entrarem no organismo, as larvas migram para diferentes órgãos, provocando processos inflamatórios e, em alguns casos, complicações mais graves, como alterações oculares, neurológicas e viscerais.

Apesar de sua relevância, a toxocaríase ainda recebe pouca atenção, sendo frequentemente subdiagnosticada e pouco discutida fora do meio científico. Além disso, as opções disponíveis para prevenção e tratamento ainda apresentam limitações, especialmente porque as formas larvais podem permanecer alojadas nos tecidos do organismo. Diante desse desafio, esta pesquisa de mestrado buscou investigar novas estratégias para prevenção da toxocaríase.

O estudo avaliou o desenvolvimento de uma vacina experimental produzida a partir de proteína recombinante de *Toxocara canis*, associada à suplementação com sobrenadante obtido a partir do cultivo do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, em modelo experimental animal (camundongos). As proteínas recombinantes são produzidas em laboratório por meio de engenharia genética contendo apenas uma parte do agente infeccioso com o objetivo de estimular o sistema imunológico de forma segura e direcionada sem risco de causar a doença. Já os probióticos, além de conhecidos por seus benefícios à saúde intestinal, produzem substâncias capazes de regular e equilibrar a resposta imunológica e, potencialmente, contribuir para o controle de infecções parasitárias.

Pesquisas como esta são importantes porque ampliam o conhecimento sobre alternativas inovadoras para o controle de doenças parasitárias negligenciadas, contribuindo para o desenvolvimento de futuras estratégias de prevenção. Além do avanço científico, estudos dessa natureza reforçam o compromisso da universidade pública com a produção de conhecimento voltado às necessidades da sociedade, transformando pesquisa em informação, inovação e impacto social.

A aproximação entre ciência e comunidade é fundamental para que doenças muitas vezes negligenciadas como a toxocaríase ganhem maior reconhecimento, prevenção e atenção em saúde pública. Dessa forma, a divulgação científica torna-se uma ferramenta essencial para tornar o conhecimento produzido na universidade mais acessível, promovendo conscientização e fortalecendo a conexão entre pesquisa, saúde e sociedade.