

SÍNTESE E CLONAGEM DO GENE MUC-2 DE *Toxocara canis* EM VETOR DE EXPRESSÃO EM *E. coli*

FELICETTI, CRISTIANE P. D.¹; LEAL, KAREN S.²; REZENDE, ANDREA DE FÁTIMA S.²; SPEROTTO, RITA²; RODRIGUES, ALEX P.²; BORSUK, SIBELE³

¹ PPG Parasitologia - UFPel crispdias@yahoo.com.br

² Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel

³ Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotecnologia – UFPel sibele@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A Larva migrans Visceral (LMV) ou toxocaríase (BEAVER et al., 1952) tem como principal agente o nematódeo *Toxocara canis* e, apesar de sua importância e ampla distribuição mundial, é uma parasitose negligenciada.

Os cães desempenham o papel de hospedeiros de vários parasitos com potencial zoonótico, entre os quais estão algumas espécies de helmintos. A contaminação humana com ovos embrionados ou estágios larvais de alguns desses helmintos pode acarretar a migração errática de suas larvas através dos tecidos e, pelo fato do homem não ser o hospedeiro habitual, elas não conseguem completar o seu ciclo evolutivo.

A infecção se dá pela ingestão acidental de ovos contendo a larva de terceiro estágio (L3), normalmente observados em solos contaminados, bem como através da transmissão vertical dessas larvas, sendo esta a principal forma de infecção observada em cães (OVERGAAUW, 1997). Ainda há casos de toxocaríase resultantes do consumo de carne crua ou mal cozida de aves ou mamíferos contendo as larvas (AKAO; OHTA, 2007; CHOI et al, 2008; HOFFMEISTER et al., 2007).

Estudos epidemiológicos de *T. canis*, em humanos, no Brasil, revelam que a soropositividade varia entre 3,7 - 40,0% (CHIEFFI et al., 2009), sendo que em algumas áreas pode atingir 50,6% - 51,6% (SCHOENARDIE et al., 2013; COLLI et al., 2010). Esta ocorrência está frequentemente associada à presença de cães (OVERGAAUW, 1997) e a contaminação ambiental por *T. canis* (TIYO et al., 2008).

O diagnóstico atual, baseado em teste de ELISA, utiliza o antígeno de secreção e excreção de *T. canis* (TES) o qual é obtido a partir do cultivo *in vitro* de larvas de *T. canis* (LIMA, 2005; CARVALHO, 2008), logo sua produção é muito trabalhosa, o que dificulta a difusão desse método de diagnóstico. Uma alternativa para a obtenção dos antígenos em grandes quantidades e de modo mais simples é a utilização de proteínas recombinantes nos testes de diagnóstico. Alguns componentes do TES já foram descritos como as proteínas de 32 kD (TES-32), 55 kD (TES-55), 70 kD (TES-70), 120 kD (TES-120) e 400 kD (TES-400) (MAIZELS; DE SAVIGNY; OGILVIE, 1984).

O TES possui outros componentes antigênicos que ainda não foram identificados, e que podem ser alvos para utilização em testes de diagnóstico ou mesmo para vacinas. Recentemente, através da Espectrometria de Massa (MS), nosso grupo identificou a presença da proteína de excreção/secreção MUC-2, componente do TES, registrada no GenBank AF167707.1 (TETTEH et al., 1999), a qual ainda não foi utilizada no diagnóstico da toxocaríase.

A aplicação desta proteína recombinante, em um teste de ELISA, para a identificação de anticorpos anti-*T.canis* poderá resultar em um método de

diagnóstico mais sensível, específico, de menor custo e de rápida execução, possibilitando assim um diagnóstico precoce, evitando problemas mais sérios aos pacientes infectados.

Neste contexto, o presente trabalho apresenta a síntese e a clonagem do gene MUC-2 para que, posteriormente, a proteína possa ser expressa e purificada para aplicação em um teste de ELISA.

2. METODOLOGIA

2.1 Síntese do gene

O fragmento de 548 pares de base, correspondente à proteína MUC-2, depositado no GenBank (acesso AF167707.1) foi sintetizado (Epoch Biolabs, Inc.) contendo códons preferenciais para expressão desta proteína em *Escherichia coli*.

2.2. Ligação ao vetor pAE

O fragmento de 548 pb, referente ao gene MUC-2, foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III do vetor PUC. Posteriormente, com o auxílio da enzima T4 DNA ligase, o gene foi ligado ao vetor pAE, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto da ligação foi transformado por eletroporação em células de *E. coli* Top10.

2.3 Caracterização dos clones recombinantes

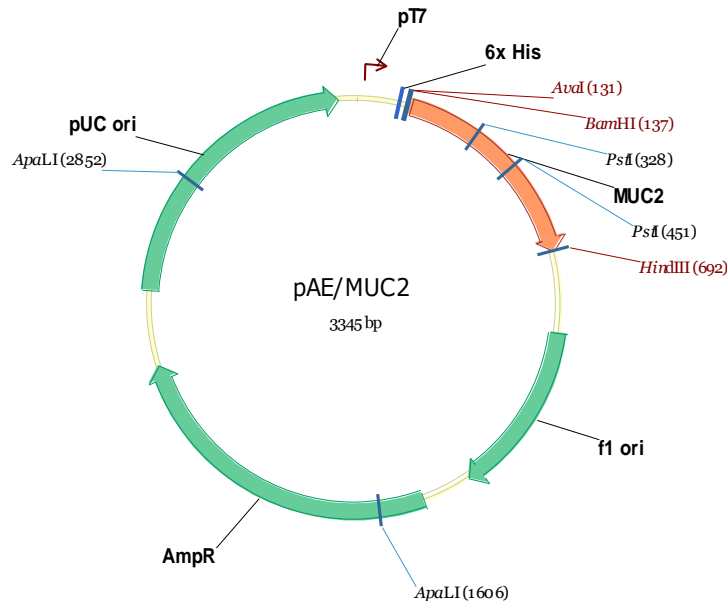
Os clones recombinantes foram caracterizados enzimaticamente com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Posteriormente foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% corando com blue green (LGC Biotecnologia).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um fragmento de 548 pb, referente ao gene MUC-2, foi sintetizado (Epoch Biolabs, Inc.) contendo códons preferenciais para expressão desta proteína em *Escherichia coli* (Figura 1). A sequência codificadora para essa proteína, a qual é um componente do antígeno TES, foi clonada no vetor de expressão em *E.coli* pAE (RAMOS et al., 2004). A caracterização dos clones recombinantes foi feita através da digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, um fragmento referente ao tamanho do gene foi liberado. O mapa do vetor pAE contendo a sequência codificadora do gene MUC-2, denominado pAE/MUC-2 pode ser observado na figura 1.

Recente estudo, utilizando as proteínas TES-26, TES-30 e TES-120, em suas formas recombinantes, demonstrou sensibilidade entre 80% e 93% e especificidade entre 92% e 96,2%, indicando que o desenvolvimento de testes de diagnóstico com antígenos recombinantes permitirão a detecção mais precisa da toxocaríase (MOHAMAD; AZMI; NOORDIN, 2009).

A proteína MUC-2 (TETTEH et al., 1999) possui potencial para diagnóstico, pois foi identificada, por Espectrometria de Massa, como componente do antígeno TES (dados não publicados). Testes de diagnóstico utilizando poucos antígenos proporcionam uma especificidade maior, diminuindo as reações cruzadas, já que muitos parasitas, especialmente os helmintos, compartilham antígenos (SMITH et al., 2009).

Figura 01: Mapa do vetor pAE contendo o gene MUC-2

4. CONCLUSÕES

O gene MUC-2 foi sintetizado e clonado com êxito. Posteriormente a proteína será expressa, purificada e aplicada em um teste de ELISA indireto, com a finalidade de obter um método de diagnóstico mais sensível, específico, de menor custo e de rápida execução, possibilitando assim um diagnóstico precoce, evitando problemas mais sérios aos pacientes infectados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAO, N; OHTA, N. **Toxocariasis in Japan**. Parasitology International, v. 56, n. 2, p. 87–93, jun, 2007.

BEAVER, P. C; SNYDER, C. H; CARRERA, G. M; DENT, J. H; LAFFERTY, J. W. **Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases**. Pediatrics, v. 9, n. 1, p. 7-19, jan, 1952.

CARVALHO, E. A. A. **Estudo caso-controle das associações entre hipergamaglobulinemia e alterações ultra-sonográficas do fígado e sorologia para toxocaríase em crianças e adolescentes atendidos em ambulatório de Infectologia Pediátrica**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) 2008 – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

CHIEFFI, P. P; SANTOS, S. V; QUEIROZ, M. L; LESCANO, S. A. **Human toxocariasis: Contribution by Brazilian researchers**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 51, n. 6, p. 301–308, São Paulo, out/dez, 2009.

CHOI, D; LIM, J. H; CHOI, D. C; PAIK, S. W; KIM, S. H; HUH, S. **Toxocariasis and ingestion of raw cow liver in patients with eosinophilia**. The Korean Journal of Parasitology, v. 46, n. 3, p. 139-143, set, 2008.

COLLI, C. M; RUBINSKY-ELEFANT, G; PALUDO, M. L; FALAVIGNA, D. L; GUILHERME, E. V; MATTIA, S; ARAUJO, S. M; FERREIRA, E. C; PREVIDELLI, I. T; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. **Serological clinical and epidemiological evaluation of toxocariasis in urban areas of south Brazil.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 52, n. 2, p. 69-74, São Paulo, mar/abr, 2010.

HOFFMEISTER, B; GLAESER, S; FLICK, H; PORNSCHLEGEL, S; SUTTORP, N; BERGMANN, F. **Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 76, n. 3, p. 600-602, mar, 2007.

LIMA, W. S. **Larva migrans.** In: NEVES, D. P; MELO, A. L; GENARO, O; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**, 11 ed. cap. 31, p. 271-274, Rio de Janeiro: Atheneu, 2005.

MAIZELS, R. M; DE SAVIGNY, D; OGILVIE, B. M. **Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae.** Parasite Immunology, v. 6, n. 1, p. 23-37, jan, 1984.

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).** Journal of Clinical Microbiology, v. 47, n. 6, p. 1712-1717, jun, 2009.

OVERGAAUW, P. **Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats.** Critical Reviews in Microbiology, v. 23, n. 3, p. 233-251, 1997.

RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.1103-1109, 2004.

SCHOENARDIE, E. R; SCAINI, C. J; BROD, C. S; PEPE, M. S; VILLELA, M. M; MCBRIDE, A. J. A; BORSÜK, S; BERNE, M. E. A. **Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil.** Journal of Parasitology, v. 99, n. 3, p. 537-539, jun, 2013.

SMITH, H. H.; TAYLOR C.; MAGNAVAL M.; SCHANTZ J.F.; MAIZELS M. **How common is human toxocariasis?** Towards standardizing our knowledge. Trends Parasitol, v. 25, p. 182-188, 2009

TETTEH, K. K; LOUKAS, A; TRIPP, C; MAIZELS, R. M. **Identification of abundantly expressed novel and conserved genes from the infective larval stage of *Toxocara canis* by an expressed sequence tag strategy.** Infection and Immunity, v. 67, n. 9, p. 4771-4779, set, 1999.

TIYO, R; GUEDES, T. A; FALAVIGNA, D. L. M; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. **Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in southern Brazil.** Journal of Helminthology, v. 82, n. 1, p. 1-6, mar, 2008.