

ESTUDO DO ANTÍGENO DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE *Toxocara canis* (TES) PARA DIAGNÓSTICO DE LMV

LUCAS RAFAEL D'ARRUIZ BARBOSA¹; RITA LEAL SPEROTTO²; LUCIANA FARIAS DA COSTA ÁVILA; NATALIA BERNE PINTO; LEONARDO MORTAGUÁ DE CASTRO; MARIA ELISABETH AIRES BERNE³

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – lucasvetf@gmail.com

²UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – ritaleal.sperotto@gmail.com

³UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – bernemea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os animais de companhia dentro do ambiente familiar, tem uma colocação importantes, sendo considerados invariavelmente membros destas famílias. Este contato próximo entre os *pets* e os proprietários favorece a transmissão de zoonoses, dentre as quais as causadas por parasitas (PINTO *et al.*, 2012). Os principais agentes zoonóticos, nesse caso, são *Toxocara canis* e *Toxocara cati*, parasitos de cães e gatos, respectivamente, agentes causadores da toxocaríase ou síndrome da Larva *Migrans* Visceral (LMV), zoonose difundida em todo o mundo. (NEGRI *et al.* 2013)

Cães e gatos infectados com *Toxocara* eliminam ovos eliminados, juntamente com suas fezes, os quais tornarem-se infectantes após o embrionamento, ou seja, ovos contendo a larva de terceiro estágio (L3) (OVERGAAUW, 1997), mas para que ocorra o embrionamento há necessidade de condições ambientais favoráveis de temperatura, umidade e oxigenação. Esses ovos embrionados podem estar presentes no solo, hortaliças, pelos de animais ou ocorrer através da ingestão de larvas presentes em carnes cruas ou mal cozidas de bovinos, ovinos, suínos ou aves, considerados hospedeiros paratênicos (OVERGAAUW, *et al.* 2013).

Segundo Schantz (1989), as infecções em humanos podem ser assintomáticas, com sintomas variados que raramente podem ter evolução fatal. A grande variabilidade de manifestações clínicas relaciona-se com a carga parasitária, frequência de infecção, distribuição das larvas nos tecidos e a intensidade da resposta inflamatória no hospedeiro.

Mas o diagnóstico da toxocaríase é dificultado principalmente pela sua diversidade de quadros clínicos, associada aos diferentes sítios (fígado, pulmões, cérebro, olhos, gânglios linfáticos, etc.), em que as larvas de *T. canis* podem se alojar no organismo humano. Diante da dificuldade na detecção de larvas de *T. canis* no organismo humano, vários métodos imunológicos foram desenvolvidos.

Dentre eles, o procedimento para obtenção dos antígenos de excreção e secreção de *Toxocara* (TES), usados para testes de diagnóstico de toxocaríase, demanda aproximadamente três a quatro meses de trabalho (SUGANE, 1983), sendo demasiadamente fastidioso e de baixa eficiência. A fração protéica do TES de massa molecular de 30 kDa foi escolhida por apresentar alta sensibilidade e especificidade em diagnóstico sorológico (YAMASAKI *et al.*, 1998, 2000).

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi realizar o estudo proteômico do antígeno TES, para fins de diagnóstico de LMV, de um modo que se possa ter um diagnóstico mais rápido e de certeza.

2. METODOLOGIA

No primeiro momento, foram localizados cães de quatro a oito semanas de idade infectados naturalmente por *T. canis*, e para a recuperação de exemplares do parasito foi utilizado o pamoato de pirantel (15 mg/kg), administrado via oral, e doze horas após realizada a administração, houve a coleta das fezes eliminadas, as quais continham os parasitas. Estes foram levados ao laboratório onde primeiramente realizou-se a sexagem. As fêmeas adultas obtidas foram submetidas à histerectomia para retirada dos úteros, e estes foram abertos com auxílio de agulhas histológicas para liberação dos ovos. Após lavagens sucessivas em solução fisiológica aos ovos foram adicionado solução de formalina a 2%, incubados a 28° e 80 UR por 28 dias, com aeração duas vezes ao dia.

Esse procedimento foram necessário para obter a maior percentagem de embrionamento. Após esse período os ovos embrionados foram lavados em PBS para remoção da formalina e depois submetidos a uma solução de hipoclorito de sódio, para remoção das camadas do ovo (proteica e quitinosa), em seguida foi realizada uma nova lavagem para retirada do hipoclorito de sódio. Sob condições assépticas, os ovos foram submetidos à agitação mecânica em Erlenmeyer com pérolas de vidro e meio de cultura RPMI (com 1% de glicose, 100UI/mL de penicilina, 100UI/mL de estreptomicina e 2,5UI/mL d de anfotericina B, para liberação das larvas, que foram recolhidas através da técnica de Baermam. Este procedimento foi realizado mensalmente, obtendo-se seis partidas de larvas e cada partida foi mantida no mínimo por três meses para obtenção do TES.

O sobrenadante das culturas de larvas contendo os produtos de excreção e secreção foram coletado semanalmente e filtrado através da membrana de 0,22 µm (Millipore), seguindo-se o congelamento a -20°C. Após, obtenção de no mínimo dois litros de sobrenadante foi realizada a concentrado por ultrafiltração a 4°C através do “Stirred Cell” (Sigma), utilizando uma membrana PTGC (Sigma U-4005), com limite de exclusão de 10 kDa. A seguir, foi feita uma diálise do material contra água deionizada a 4°C, durante 24 a 28 horas. Para obtenção do antígeno TES o material dialisado foi liofilizado. A dosagem de proteínas do antígeno TES foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando microplacas e espectrofotômetro (filtro 570nm).

Para determinar as frações protéicas dos antígenos foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na concentração de 12%, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e gel de empilhamento na concentração de 5% em tampão Tris/HCl 1,M, pH 6,8. Cada partida do antígeno (TES) foi ensaiado na concentração de 20µg em tampão de amostra com condições redutoras (SDS a 10%, azul de bromofenol a 0,5%, Tris-HCl 0,25M pH 6,8, glicerol a 50% e β mercaptoetanol a 3%). A corrida eletroforética foi realizada em cuba “Mini Protean II”(Bio Rad), contendo tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,250M e SDS a 0,1%) e voltagem constante de 150V. O marcador de peso molecular de 10-220 kDa (Invitrogen- Bench Mark TM)

foi utilizado para estimar o peso das frações dos antígenos através da visualização das bandas protéicas no gel corado com azul de Coomassie R-250.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos de larvas provenientes dos ovos retirados das fêmeas de *T. canis*, originaram quatro partidas do antígeno TES, cujas concentrações proteicas foram de 1,6µg/µl, 1,3µg/µl e 0,85µg/µl e 0,9785µg/µl. O perfil eletroforético do TES e foi determinado utilizando gel de poliacrilamida SDS – PAGE 12%.

As Frações protéicas do antígeno TES produzido no perfil eletroforético representados são mostradas na figura 1. Na canaleta 1 tem-se o marcador de peso molecular (10 –220 kDa) e na canaleta 2 o TES, na concentração de 20µg.

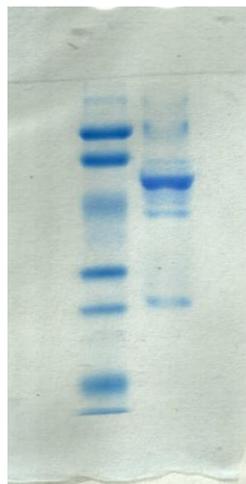


Figura 1-PERFIL ELETROFORÉTICO DO ANTÍGENO TES de *Toxoca canis*

O resultado do antígeno TES apresentou várias frações de glicoproteínas entre 10 e 220 kDa, sendo três mais evidentes com aproximadamente 30 e 70 e 120 kDa e algumas menos evidentes entre 25 e 35 kDa, 41 e 53 kDa e entre 60 e 70 kDa.

O antígeno TES-30 de *T. canis* induz resposta imune nos hospedeiros, principalmente através da produção de IgG, tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. Porém, tendo-se em vista a problemática na produção do antígeno TES nativo, a expressão heteróloga de antígenos TES que reajam com soros específicos de hospedeiros infectados é de extrema importância para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico para toxocarose humana, assim como para a produção de vacinas recombinantes de subunidade.

Outro antígeno que também se destaca, e o TES-120 que apresenta alta especificidade quando testado contra soros de pacientes com toxocarose confirmada (FONG *et al.*, 2004).

4. CONCLUSÕES

A utilização dos TES-30 e TES-120 para fins de diagnóstico é promissor, entretanto a presença de várias bandas no TES indica a necessidade de utilizar outras metodologias para aprimorar o diagnóstico de LMV.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAVER, P. C.; SNYDER, H.; CARRERA, G; Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans: report of three cases. **Pediatrics** 9:7-19, 1952.

FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Recombinant expression of the larval excretory/secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**, v. 92, p. 173-176, 2004

NEGRI E. C.; SANTARÉM V. A.; ELEFANT, G. R.; GIUFFRIDA, R. Anti-Toxocara spp. antibodies in an adult healthy population: serosurvey and risk factors in Southeast Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3 (3), p. 211-216, 2013.

OVERGAAUW P. A. M.; VAN KNAPEN F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Vet Parasitol.** 2013.

PINTO, N. B.; RASSIER, G. L.; DE CASTRO, L. M.; BARBOSA, L. R. D.; BERNE, M. E. A.; SPEROTTO, R. L. Frequência de parasitas intestinais em cães adultos da região do Capão do Leão, Rio Grande do Sul. In: **Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA**. Bagé, 2012.

SUGANE, K & OSHIMA, T. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. **Immunology**, v.50, n.1, p.113-120, 1983

YAMASAKI, Hiroshi.; ARAKI, Kunioki.; LIM, Patricia Kim Chooi.; ZASMY, Ngah.; MAK, Joon Wah.; TAIB, Radzam.; AOKI, Takashi. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1409-13, 2000.