

EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS TES-30 E TES-120 DE *Toxocara canis* EM *Escherichia coli*

LUISA DOMINGUES SCAPIN¹; CAROLINA GEORG MAGALHÃES; FABRÍCIO RIBEIRO PEREIRA; PAULA FONSECA FINGER²; MICHELE SOARES PEPE²; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹UFPel - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – luisascapin@outlook.com

²UFPel - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec

³UFPel - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, – fabriciorc@pop.com.br

1. INTRODUÇÃO

Apesar de sua importância e ampla distribuição mundial, a toxocaríase é uma parasitose negligenciada, acarretando um problema de saúde pública. Estudos epidemiológicos vem mostrando a ocorrência de muitos casos de toxocaríase (Macpherson, 2005), estando frequentemente associados a presença de cães (Overgaauw, 1997) e a contaminação ambiental por *T. canis* (Tiyo *et al.*, 2008) e acometendo principalmente as crianças com idade entre um e três anos.

O diagnóstico da toxocaríase é dificultado principalmente pela sua diversidade de quadros clínicos, associada aos diferentes sítios em que as larvas de *T. canis* podem se alojar no organismo humano. Atualmente, tem sido utilizado como método padrão o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES), com adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* sp., que apresenta alta sensibilidade e especificidade.

O antígeno TES é obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis* (Lima *et al.*, 2005), e a sua produção é laboriosa, demorada, de capacidade limitada (Mohamad *et al.*, 2009), sendo necessário técnicos treinados (Peixoto *et al.*, 2011) e disponibilidade de fêmeas adultas de *T. canis*, além de observar-se reação cruzada desse antígeno com outras infecções helmínticas (Magnaval *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 2000). O fracionamento do antígeno e isolamento de suas proteínas diminui a possibilidade dessas reações cruzadas e poderia otimizar a especificidade dos testes sorológicos (Peixoto *et al.*, 2011).

As principais proteínas do antígeno TES apresentam 32 kDa (TES-32), 55 kDa (TES-55), 70 kDa (TES-70), 120 kDa (TES-120) e 400 kDa (TES-400) (Maizels *et al.*, 1984), sendo as proteínas TES-30 e TES-120 as de maior interesse e as mais estudadas em ensaios de imunodiagnóstico (Yamasaki *et al.* 2000; Fong & Lau 2003; Mohamad *et al.* 2009).

Antígenos recombinantes são uma alternativa a produção laboriosa e de baixa eficiência do antígeno TES, possibilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos imediatos, além da avaliação de candidatos vacinais. Com isso, o objetivo do trabalho foi produzir antígenos TES-30 e TES-120 de *Toxocara canis* no sistema de expressão procarioto.

2. METODOLOGIA

Os genes sintéticos para os antígenos TES30 e TES120 de *T. canis* foram clonados no vetor pAE de expressão em *E. coli*, segundo Sambrook & Russel (2001). O produto da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 através de choque térmico. Os clones recombinantes foram selecionados através de uma

triagem por extração rápida de DNA plasmideal com fenol-clorofórmio e confirmados por digestão com enzimas de restrição.

Através de choque térmico, a cepa Star foi clonada com os plasmídeos pAE/TES30 e pAE/TES120, sendo cultivada em caldo LB (100 µg/mL de ampicilina) por 18h, sob agitação à 37°C. A partir de cada inóculo, foram cultivados em caldo LB (100 mL) até a fase log de crescimento (DO₆₀₀=0,6-0,8) em agitador orbital (37°C, 250 rpm). A expressão dos antígenos recombinantes foi induzida por 3 h com 0,3 mM de IPTG. Após, os cultivos foram centrifugados (6.000xg por 10 minutos, a 4°C), ressuspensos em Akta Wash e submetido à sonicação (7 ciclos de 20'). Após centrifugação, o sobrenadante foi armazenado e o *pellet* foi ressuspendido em solução Akta Wash com N-LauroylSarcosine 0,2%, sendo mantido por 48h, sob agitação, a 4°C. Novamente o material foi centrifugado, armazenado o sobrenadante e o *pellet* ressuspendido em Akta Wash com 6M uréia, sendo mantido por 48h, sob agitação, a 4°C e finalmente centrifugado, armazenando o sobrenadante. O sobrenadante da sonicação, do tratamento com Akta Wash/N-LauroylSarcosine e do tratamento com Akta Wash/Uréia foi observado em *Western blot* frente ao MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase (1:6000) e soro ovino positivo para *T. canis* (1:1000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através de *Western blot* frente a histidina é possível observar um banda entre 25-35 kDa para o clone pAE/TES120 e uma banda de aproximadamente 25kDa para o clone pAE/TES30, ambas nas amostras de sobrenadante de cultivo após a indução com IPTG e na lavagem do sobrenadante com Akta Wash/Uréia (Fig.1). Os resultados corroboram com estudos anteriores (Yamazaki et al, 1998; Yamasaki et al., 2000; Mohamad et al., 2009), indicando a possibilidade de utilização dessas proteínas para o diagnóstico da toxocaríase.



Figura 1 – *Western Blot* das lavagens da sonicação do pellet de pAE/TES120 e pAE/TES30 com Akta Wash/N-LauroylSarcosine e Akta Wash/Uréia frente a histidina (1:6000). Canaletas: 1 - Cepa Star, 2 – pAE/TES120 induzida, 3 - pAE/TES120 Akta Wash/N-LauroylSarcosine, 4 - pAE/TES120 Akta Wash /Uréia, 5 – Marcador de peso molecular, 6 - pAE/TES30 induzida, 7 - pAE/TES30 Akta Wash/N-LauroylSarcosine, 8 - pAE/TES30 Akta Wash/Uréia.

Para caracterização das proteínas recombinantes produzidas em *E. coli*, foi realizado ensaio de reconhecimento dessa proteína por anticorpos anti-*T. canis* presentes em soros de ovinos experimentalmente infectados. Por *Western blot* foi observada o reconhecimento dos antígenos frente a soro ovino positivo de *T. canis* para as amostras de sobrenadante de cultivo após a indução com IPTG e na lavagem do sobrenadante com Akta Wash/Uréia (Fig. 2), semelhante ao resultado obtido no *Western blot* frente a histidina. A caracterização das proteínas recombinantes normalmente é realizada frente a soros humanos positivos para *T. canis* (Yamasaki *et al.* 2000; Mohamad *et al.* 2009; Fong & Lau 2003), sendo a utilização de soros obtidos de ovinos experimentalmente infectados uma alternativa para a confirmação da reatividade dessas proteínas com anticorpos de *T. canis*.

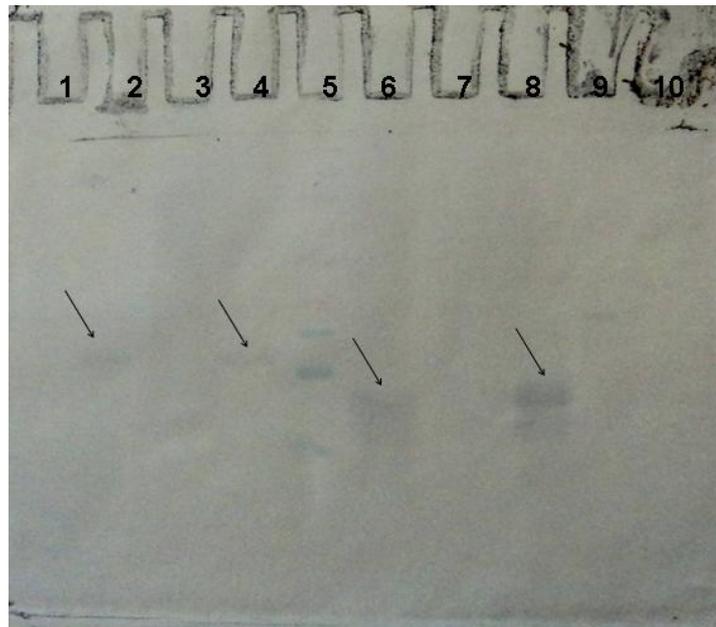


Figura 2 – *Western Blot* das lavagens da sonicação do pellet de pAE/TES120 e pAE/TES30 com Akta Wash/N-LauroylSarcosine e Akta Wash/Uréia frente a soro ovino positivo para *T. canis* (1:1000). Canaletas: 1 - Cepa Star, 2 – pAE/TES120 induzida, 3 - pAE/TES120 Akta Wash/N-LauroylSarcosine, 4 - pAE/TES120 Akta Wash /Uréia, 5 – Marcador de peso molecular, 6 - pAE/TES30 induzida, 7 - pAE/TES30 Akta Wash/N-LauroylSarcosine, 8 - pAE/TES30 Akta Wash/Uréia.

4. CONCLUSÕES

Através da metodologia empregada foi possível expressar as proteínas TES30 e TES120 em *E. coli*, as quais formam corpos de inclusão e são solubilizadas em Akta Wash/Ureia. Essas proteínas apresentam afinidade por anticorpos anti-*T. canis*, o que poderá, futuramente, possibilitar os estudos de validação dessas proteínas, com o objetivo de estabelecer especificidade e sensibilidade destes antígenos em técnicas diagnósticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beaver, P. C. 1969. The nature of visceral larva migrans. *J. Parasitol* 55: 3-12.

Fillaux, J. J., Magnaval, F. 2013. Laboratory diagnosis of human toxocariasis. **Veterinary Parasitology** **193**: 327-336.

Fong, M. Y., Y. L. Lau, I. Init, I. Jamaiah, A. K. Anuar, and N. Rahmah. 2003. Recombinant expression of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens TES-120 in *Escherichia coli*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health** **34**:723-726.

Lima, W.S. **Larva migrans** In: Neves, D.P.; Melo, A.L.; Genaro, O.; Linardl, P.M.; Parasitologia Humana, 11^a ed. Rio de Janeiro, Atheneu, cap.31, p. 271-274, 2005.

Macpherson, C.N., 2005. Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. **Int. J. Parasitol.** **35**:1319-1331

Magnaval, J.F.; Fabre, R.; Maurières, P.; Charlet, J.P.; De Larrard, B. 1991 Application of the *Western blotting* procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology Research**, **77**:697-702.

Maizels, R.M.; De Savigny, D.; Ogilvie, B.M. 1984 Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, **6**:23-37.

Mohamad, S.; Azmi, N.C.; Noordin, R. 2009 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** **47**(6):1712-1717

Overgaaouw, P., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Toxocariasis in dogs and cats. **Crit. Rev. Microbiol.** **23**:233-251.

Peixoto, P.L.; Nascimento, E.; Cançado, G.G.L.; Miranda, R.R.C.; Rocha, R.L.; Araújo, R. N.; Fujiwara, R.T. 2011 Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **106**(2): 200-206.

Sambrook, J. & Russel. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual**. In (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.

Tiyo, R., Guedes, T.A., Falavigna, D.L.M., Falavigna-Guilherme, A.L., 2008. Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in southern Brazil. **Journal Helminthology**, **82**:1-6.

Torgerson, P.R.; Budke, C.M. Economic Impact of *Toxocara spp.* Cap. 19. In: Holland, C.V; Smith, H.V. **Toxocara the enigmatic parasite**. CABI Publishing: Oxfordshire, UK., 281-193. 2006.

Yamasaki, H.; Araki, K.; Lim, P.K.; Zasmy, N.; Mak, J.W.; Taib, R.; Aoki, T. 2000 Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **J. Clin. Microbiol.** **38**(4):1409-13.