

EXTRAÇÃO DE DNA DE *Toxocara canis*: COMPARAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS PARA PADRONIZAÇÃO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TOXOCARIÁSE

WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO¹; MICAELE QUINTANA DE MOURA²,
LEONARDO MORTÁGUA DE CASTRO², LUCIANA FARIAS DA COSTA AVILA²,
LUCIANO DA SILVA PINTO³; MARIA ELISABETH AIRES BERNE⁴

¹Universidade Federal de Pelotas 1 - wesley.bio.ufrpe@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - micaele.q.m@live.com

³BioPro Lab. CDTec/Biotecnologia, UFPel - dmpluc@ufpel.edu.br

⁴Laboratório de Helminologia/Instituto de Biologia, UFPel - bernemea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é um problema de saúde pública incluída no contexto das doenças negligenciadas. Esta zoonose é causada por parasitos descritos no Filo Nematoda, sendo as principais espécies relacionadas à infecção *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (POULSEN et al., 2015). A toxocaríase é uma infecção acidental ocorrente no homem e outros hospedeiros paratênicos, portanto a sintomatologia clínica é muito diversificada, incluindo casos assintomáticos, toxocaríase visceral e toxocaríase ocular (BROUCKE et al, 2015).

O diagnóstico atualmente é realizado através de análise conjunta dos dados clínico-epidemiológicos, associados à contagem de eosinófilos e a detecção de imunoglobulinas específicas da classe G (WATTHANAKULPANICH, 2010).

O diagnóstico baseado em metodologias imunológicas é complexo no que se refere às reações cruzadas inespecíficas. Assim, é necessário que se faça adsorção prévia dos soros com antígenos somáticos de *Ascaris* spp., pois alguns anticorpos do hospedeiro podem reconhecer epítomos antigênicos semelhantes a outras espécies de ascarídeos (SAHU et al, 2013, JIN et al., 2013).

As vantagens dos testes moleculares seriam a elevada sensibilidade, podendo detectar quantidades muito pequenas de DNA e alta especificidade, pois na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizados oligômeros específicos para o genoma parasitário em questão. Alguns estudos com intuito de detectar DNA de *T. canis* em modelos experimentais já foram realizados, porém, é necessário que novas pesquisas sejam realizadas no que se refere à padronização de técnicas viáveis para uso rotineiro em laboratórios clínicos (DURANT et al., 2012, ZIBAEI et al., 2013).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de extração de DNA de larvas de *Toxocara canis*, e constatar o método mais adequado por meio da técnica de PCR convencional para uso como controle positivo no diagnóstico molecular da toxocaríase.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção dos ovos e extração das larvas de *Toxocara canis*

Ovos foram coletados de fêmeas de *T. canis*, colocados em formalina a 2% e incubados em estufa BOD por 28° C, por 30 dias para o embrionamento (AVILA et al., 2012). A técnica para a extração e o cultivo das larvas foi realizada de acordo com DE SAVIGNY (1975) e AVILA (2013).

2.3. Contagem das larvas e extração de DNA genômico

Aproximadamente 20 larvas foram utilizadas para procedimento de extração de DNA através do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®) e também pelo método *in house* com Fenol/Clorofórmio (SAMBROOK et al, 2001). Ambas as técnicas foram realizadas utilizando larvas viáveis.

2.4. Reação em Cadeia da Polimerase convencional e Eletroforese

Para amplificação de DNA foram utilizados oligoiniciadores (F: 5' GGCTAAGCCATGCATGTC 3', R: 5' ACTTGATAGACACGTCGCC 3') específicos do gene 18s RNA ribossômico (PINELLI et al., 2013).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo: 3 µL de DNA genômico (molde), 0,5 µL de cada oligômero iniciador a 10 pmol/µL, 0,5 µL dNTPS, 1U de *Taq* Dna Polimerase, 5 µL de tampão Flexi Buffer (5X), 2 µL de MgCl₂ a 25 µM (Promega®) e 13,3 µL de água livre de RNase/DNase (Sigma®). As temperaturas foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida de 45 ciclos com desnaturação a 95 °C por 10 s, anelamento a 58 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 20 s, usando um termociclador (Amplitherm – Thermal Cycles), mantendo, após os ciclos, a temperatura de 4 °C. Como controles (positivo e negativo) foram utilizados DNA obtido de parasito adulto e água, respectivamente.

A eletroforese foi realizada com volume final de 8 µL em gel de agarose a 2%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível com os dois métodos utilizados realizar a extração de DNA de *Toxocara canis*, o que foi comprovado através da amplificação de sequência genômica do parasito pela técnica de PCR e visualização dos amplicons em gel de agarose a 2% (Figura 1).

Com a comparação dos métodos, foi observado que o Kit comercial demanda um menor tempo de execução da técnica e garante uma boa extração. A utilização de DNA, extraído direto das larvas do parasito foi de suma importância para a comprovação da especificidade da técnica aplicada, indicando que os oligômeros utilizados são adequados. A partir dos dados obtidos, será possível padronizar a técnica para detecção de DNA do parasito no sangue e em órgãos de animais modelos, infectados experimentalmente, permitindo sua aplicação para o diagnóstico da toxocaríase.

Embora alguns trabalhos mencionem a importância de realizar uma maceração mecânica pré-extração de DNA (MESQUITA et al., 2001; SCORSATO & TELLES, 2011; JEDDI et al., 2013), a utilização de pérolas de vidro para maceração das larvas não se mostrou necessária.

O kit comercial e o método do fenol/clorofórmio mostraram-se adequados em degradar a cutícula e romper as membranas celulares das larvas, permitindo uma boa extração de DNA genômico como pode ser observado na figura 1.

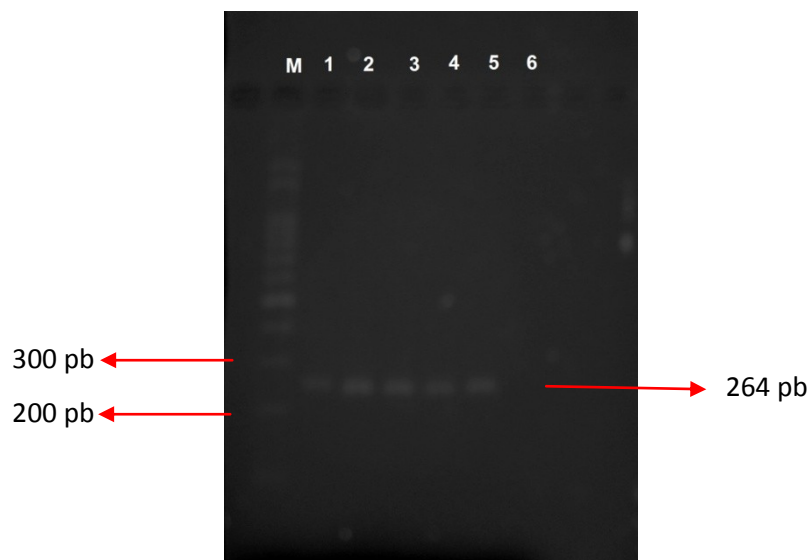


Figura 1 – Produtos da amplificação de DNA de larvas de *Toxocara canis* (PCR) em gel de agarose 2%. (M) Marcador de peso molecular 1Kb plus; (1-2) Extração com Kit comercial; (3-4) Extração com Fenol/Clorofórmio; (5) DNA de *T. canis* adulto (6) Controle negativo

4. CONCLUSÕES

Ambas as técnicas foram eficientes para extração de DNA genômico das larvas de *Toxocara canis*, entretanto o método do fenol/clorofórmio demanda maior tempo de execução, o que torna o kit comercial mais eficiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA, L.F.C. **Efeito imunomodulador de *Saccharomyces boulardii* em camundongos experimentalmente infectados por *Toxocara canis***. 2013. 71f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

AVILA, L.F.C.; CONCEIÇÃO, F.R.; TELMO, P.L.; DUTRA, G.F.; DE LOS SANTOS, D.G.; MARTINS, L.H. R; BERNE, M.E. A.; SILVA, P.E.; SCAINI, C.J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. **Vet Parasitol**, v.187, p. 337-40, 2012.

BROUCKE, S.V.D.; KANOBANA, K.; POLMAN, K.; SOENTJENS, P.; VEKEMANS, M.; THEUNISSEN, C.; VLIEGHE, E.; ESBROECK, M.V.; JACOBS, J.; ENDEN, E.V.D.; ENDE, J.V.D.; GOMPEL, A.V.; CLERINX, J.; BOTTIEAU, E. Toxocariasis Diagnosed in International Travelers at the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, from 2000 to 2013. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3: e0003559, 2015. doi:10.1371/journal.pntd.0003559

DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple diagnosis of parasitic and fungal diseases. method for the production of *Toxocara*

ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, v. 61, p.781-2, 1975.

DURANT, J.; IRENGE, L.M.; FOGT-WYRWAS, R.; DUMONT, C.; DOUCET, J.; MIGNON, B.; LOSSON, B.; GALA, J. Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples. **Parasites & Vectors**, v. 288, n. 5, p. 1-9, 2012.

JEDDI, F.; PIARROUX, R.; MARY, C. Application of the NucliSENS easyMAG system for nucleic acid extraction: optimization of DNA extraction for molecular diagnosis of parasitic and fungal diseases. **Parasite**, v. 20, n. 52, 2013.

JIN, Y.; SHEN, C.; HUH, S.; SOHN, W.; CHOI, M.; HONG, S. Serodiagnosis of Toxocariasis by ELISA using crude antigen of *Toxocara canis* larvae. **Korean J Parasitol**, v. 51, n. 4, p. 433-439, 2013.

MESQUITA, R.A.; ANZAI, E.K.; OLIVEIRA, R.N.; NUNES, F.D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 314-319, 2001.

PINELLI, E.; ROELFSEMA, J.H.; BRANDES, S.; KORTBEEK, T. Detection and identification of *Toxocara canis* DNA in bronchoalveolar lavage of infected mice using a novel real-time PCR. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 337– 341, 2013.

POULSEN, C.S.; SKOV, S.; YOSHIDA, A.; SKALLERUP, P.; MARUYAMA, H.; THAMSBORG, S.M.; NEJSUM, P. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* – is it possible? **Parasite Immunology**, n. 37, p. 204–207, 2015.

SAHU, S.; SAMANTA, S.; SUDHAKAR, N.R.; RAINA, O.K.; GUPTA, S.C.; GOSWAMI, T.K.; MADHU, D.N.; KUMAR, A. Characterization of somatic antigens of adult *Toxocara canis* by western blotting. **Vet World**, v. 6, n. 7, p. 424-427, 2013.

SAMBROOK, J. FRITCH, E. F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. v. 3, 2e.d. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SCORSATO, A.P.; TELLES, J.E.Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p. 541-548, 2011.

WATTHANAKULPANICH, D. Diagnostic trends of human toxocariasis. **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 33, n.1, p. 44-52, 2010.

ZIBAEI, M.; SADJJADI, S.; KARAMIAN, M.; UGA, S.; ORYAN, A.; JAHADI-HOSSEINI, S.H. A comparative histopathology, serology and molecular study, on experimental ocular toxocariasis by *Toxocara cati* in Mongolian Gerbils and Wistar Rats. **BioMed Research International**, Article ID 109580, 5 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/109580>, 2013.