

DNA DE *Toxocara canis* EM TECIDOS DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.

MICAELE QUINTANA DE MOURA¹; WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO²;
NATÁLIA BERNE PINTO²; MARCIA RAQUEL PEGORARO DE MACEDO²;
LUCIANA FARIAS DA COSTA AVILA²; MARIA ELISABETH AIRES BERNE³

¹Universidade Federal de Pelotas – micaele.q.m@live.com

²Universidade Federal de Pelotas – Wesley.bio.ufrpe@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma doença de caráter zoonótico (ABDI et al., 2012). Sendo *Toxocara canis* o principal agente etiológico (ROLDÂN et al., 2009). No homem, hospedeiro accidental, a forma evolutiva encontrada são larvas (L3), que permanecem nos tecidos em migração ou encistadas, ocasionando diversos sinais clínicos, desde quadros assintomáticos a formas sistêmicas, como a larva *migrans* visceral (LMV), larva *migrans* ocular (LMO) e toxocaríase neurológica (MENDONÇA et al., 2013).

A infecção do homem ocorre através da ingestão de ovos embrionados (VIEIRA et al., 2013), e ou por consumo de carne crua ou mal cozida de animais, contendo larvas vivas encistadas (STRUUBE et al., 2013). A toxocaríase acomete principalmente crianças (SCHOENARDIE et al., 2013), não possuindo um tratamento totalmente eficaz (BARRERA, 2010), e sendo uma parasitose de difícil diagnóstico (SAHU et al, 2013; ANDRADE, 2000).

O que está disponível de mais efetivo para o diagnóstico da toxocaríase são os testes sorológicos, sendo atualmente a técnica diagnóstica mais empregada o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que garante razoável especificidade, no entanto, por utilizar抗ígenos de excreção e secreção de larvas (TES) podem ocorrer reações cruzadas com outros parasitos da superfamília Ascaroidea (WATTHANAKULPANICH, 2010).

Além disso nos testes sorológicos podem ocorrer falsos negativos, especialmente em casos de LMO onde a produção de imunoglobulinas é tipicamente baixa (MORAIS et al., 2012; WATTHANAKULPANICH, 2010). Neste contexto, testes diagnósticos utilizando biologia molecular vem sendo testados como alternativas na identificação e diagnóstico de parasitos (PINELLI et al., 2013; BORECKA et al., 2008).

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de PCR como possibilidade diagnóstica para Toxocaríase aguda e crônica.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados um total de 6 camundongos Swiss fêmeas de quatro a oito semanas de idade. Os animais (2) foram inoculados com 1500 ovos embrionados através de gavagem por sonda gástrica, tendo sido divididos em dois grupos, (G1) eutanásia 48 h após a infecção e (G2) 30 dias após a infecção. Cada grupo possuía um animal controle que foi mantido nas mesmas condições do grupo teste.

Os animais após serem submetidos a eutanásia tiveram o encéfalo e fígado removidos, os órgãos foram então macerados e fracionados em tubos do

tipo eppendorff de (20mg a 50m g). Os tecidos passaram por uma etapa de congelamento de no mínimo 24 h antes de iniciar a extração de DNA.

As extrações foram realizadas através de kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®). Para amplificação do DNA foram utilizados primers da região ITS (F: 5'AAGAAATGGCTGTCGTTGC3') e (R:5'ACCTGCCACAACCAAACAAT3'). Cada reação de PCR foi realizada com 25µL de Master Mix 2X (Promega®), 1,5 de cada primer (20 µM), 15µL de DNA genômico e 7,0µL de água livre de DNase/RNase para completar um volume de 50µL. As temperaturas foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C/5min; seguida de 35 ciclos de desnaturação: 95°C/30s; anelamento 55°C/30s; e extensão:72°C/30s; e extensão final a 72°C/ 7 min, com arrefecimento até 4°C. Foram utilizados como controles positivos adulto e pool de 500 larvas de *T. canis* e como controle negativo tecidos (encéfalo e fígado) de camundongos não infectados. A eletroforese foi realizada com volume final de 8µL em gel de agarose a 2%. Posteriormente, uma amostra positiva de cada grupo e um controle positivo foram sequenciadas pela empresa Macrogen® Korea e analisado através do programa Mega 7.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA – 7921).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar os amplicons em gel de agarose a 2% nas amostras de fígado de animal com Toxocariase aguda (G1) e no encéfalo de animal com a doença na fase aguda e crônica (G2), também foi observado a amplificação dos dois controles positivos e a ausência de bandas nos controles negativos, indicando a correta amplificação do DNA do *T. canis* (Figura 1). Esses resultados foram confirmados através de sequenciamento molecular, como apresentados na Tabela1.

A presença de DNA do parasito no fígado durante a infecção aguda e no encéfalo na infecção crônica é compatível com outros estudos que demonstraram por técnicas de digestão tecidual um maior encontro de larvas no fígado e encéfalo durante a infecção aguda e crônica, respectivamente (AVILA et al., 2012), no entanto neste trabalho também foi amplificada DNA de *T. canis* no encéfalo do grupo G1, demonstrando a sensibilidade da técnica para este órgão.

Apesar do desenvolvimento de抗ígenos recombinantes para realização de testes sorológicos, estes抗ígenos ainda apresentam estruturas抗igênicas e imunogênicas similares ao TES bruto, possibilitando desta forma a ocorrência de reações cruzadas (WATTHANAKULPANICH, 2010), como também há possibilidades da ocorrência de falsos negativos em determinadas manifestações da doença, como na toxocaroze ocular (MORAIS et al., 2012; WATTHANAKULPANICH, 2010). Assim, o diagnóstico através da técnica de PCR pode ser uma alternativa promissora para identificação do DNA do parasito de interesse em tecidos animais (PINELLI et al., 2013; BORECKA et al., 2008).

Além disso, sabe-se que embora seja *T. canis* a espécie causadora da toxocariase de maior prevalente, o *Toxocara cati* também é capaz de infectar o homem e animais (ROSSACK et al., 2008; FU et al., 2014). Portanto, a técnica de PCR pode não apenas ser uma alternativa no diagnóstico à toxocariase, bem como ser utilizada em estudos epidemiológicos sobre a espécie de nematóide envolvida (FOGT-WYRWAS et al., 2007; ZHU et al., 2001).

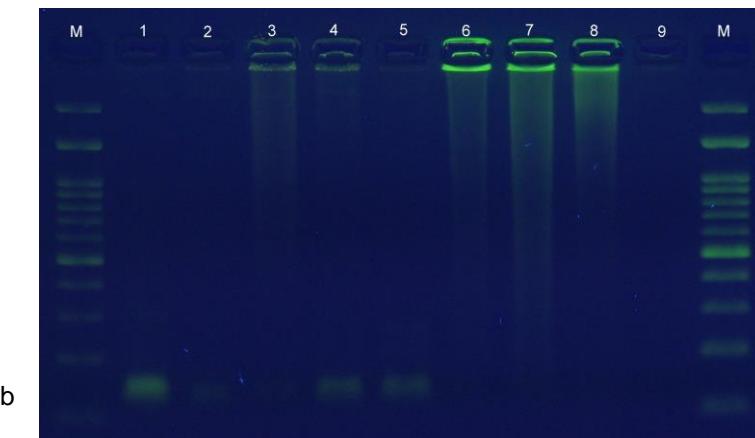


Figura 1: Produtos da amplificação de DNA (PCR) de *Toxocara canis* em gel de agarose 2%: (M) Marcador molecular; (1) Adulto (controle positivo); (2) 500 larvas (controle positivo); (3) G1: Encéfalo; (4) G1: Fígado; (5) G2: Encéfalo; (6) G3: Fígado; (7) Encéfalo (controle negativo); (8) Fígado (controle negativo) (9) Branco.

T. canis	C	G	G	T	G	T	T	G	G	T	T	T	G	T	T	G	C	A	A	A	C	G	A
Adulto	[30]
Encéfalo	[30]
Fígado	[30]
T. canis	C	C	T	C	C	G	C	G	A	T	A	G	C	A	C	T	T	C	[48]				
Adulto	G	C	[48]				
Encéfalo	G	C	[48]				
Fígado	G	C	[48]				

Tabela 1: Alinhamento do DNA das sequências de *Toxocara canis* (gene bank - KY018699) com as sequências derivadas dos produtos ITS-PCR isoladas a partir de adulto de *T. canis* e tecido de encéfalo e fígado de camundongo infectado, confirmando a infecção experimental por *T. canis*.

4. CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa demonstram que a técnica de PCR pode ser uma alternativa aos métodos diagnósticos convencionais para toxocariase, podendo inclusive fornecer dados de maior acurácia sobre a epidemiologia das espécies de *Toxocara*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, J.; DARABI, M.; SAYEHMIRI, K. Epidemiological Situation of Toxocariasis in Iran: Meta-analysis and Systematic Review. **Pakistan Journal of Biological sciences**, v. 15, n. 22, p. 1052-1055, 2012.
- ANDRADE, L. D. Aspectos Clínico-epidemiológicos da Toxocariase Humana. **Revista de Patologia Tropical**, vol. 29. n. 2, p. 147-159, 2000.
- AVILA, L. F. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; TELMO, P. L.; DUTRA, G. F.; LOS SANTOS, D. G.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with Toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v.187, p. 337–340, 2012.
- BARRERA, M. G.; LEONARDI, D.; BOLMARO, R. E.; ECHEÑIQUE, C. G.; OLIVIERI, A. C.; SALOMON, C. J.; LAMAS, M. C. In vivo evaluation of

- albendazole microspheres for the treatment of *Toxocara canis* larva migrans. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 451–454, 2010.
- BORECKA, A.; GAWOR, J.; NIEDWOROK, M.; SORDYL, B. Detection of *Toxocara canis* larvae by PCR in the liver of experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Helminthologia**, v. 45, n. 3, p. 147–149, 2008.
- FOGT-WYRWAS, R.; JAROSZ, W. & MIZGAJSKA-WIKTOR, H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. **Journal of Helminthology**, v. 81, n.1, p. 75-78, 2007.
- FU, C.; CHUANG, T.; LIN, H.; WU, C.; LIU, H.; LANGINLUR, M.K.; LU, M.; HSIAO, W.W.; FAN, C. Seroepidemiology of *Toxocara Canis* infection among primary schoolchildren in the capital area of the Republic of the Marshall Islands. **BMC Infectious Diseases**, v. 261, n. 14, p. 1-7, 2014.
- MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A.; ESQUIVEL, R.; FIACCONED, R. L.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; COOPERTG, P.; BARRETO, M. B.; ALCANTARA-NEVES, N. M. Seroprevalence and risk factors for toxocara infection in children from an urban large setting in Northeast Brazil. **Acta Tropica**, 2013.
- MORAIS F.B.; MACIEL, A.L.; ARANTES, T.E.F.; ALLEMANN, C.M.N. Achados ultrassonográficos em toxocariase ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 75, n. 1, p.43-47, 2012.
- ROLDÁN, W. H.; ESPINOZA, Y. A.; HUAPAYA, P. E.; HUIZA, A. F.; SEVILLA, A. R.; JIMÉNEZ, S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru determined by dot-elisa test. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical**, v. 51, n. 2, p. 67-71, 2009.
- ROSSACK, J.; RICKETTS, P.; TE, H.S.; HART, J. A case of adult hepatic toxocariasis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 6, p. 344-348, 2008.
- 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. **Veterinary World**, v. 6, n. 7, p. 424-427, 2013.
- SCHOENARDIE, E. R.; SCAINI, C. J.; BROD, C. S.; PEPE, M. S.; VILLELA, M. M.; MCBRIDE, A. J. A.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A. Seroprevalence of *Toxocara* Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 3, p. 537-539, 2013.
- STRUUBE, C.; HEUER, L.; JANECEK, E. *Toxocara* spp. Infections in paratenic hosts. **Veterinay Parasitology**, 2013.
- VIEIRA, J.N.; PEREIRA, C.P, BASTOS, C.G.G.; NAGEL, A.S.; ANTUNES, L.; VILLELA, M.M. Parasitos em hortaliças comercializadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.1, p.45-49, 2013.
- WATTHANAKULPANICH, D. Diagnostic Trends of Human Toxocariasis. **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 44-52, 2010.
- ZHU, X.Q.; GASSER, R.B.; CHILTON, N.B. & JACOBS, D.E. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. **Journal of Helminthology**, Vol.75, No.2, pp. 101-8, 2001.