

## REATIVIDADE DE TES-30 E TES-120 RECOMBINANTE COM SOROS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE POR *Toxocara Canis* OU *Toxocara Cati*

MORGANA LÜDTKE AZEVEDO<sup>1</sup>; LUCAS MOREIRA DOS SANTOS<sup>1</sup>; GIULI MARQUES ARGOU<sup>1</sup>; RAFAEL RODRIGUES<sup>1</sup>; LUCIANA FARIAS DA COSTA DE ÁVILA<sup>2</sup>; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [morganaludtke@gmail.com](mailto:morganaludtke@gmail.com);

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande - [lucostaavila@hotmail.com](mailto:lucostaavila@hotmail.com);

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fabricao.rochedo@ufpel.edu.br](mailto:fabricao.rochedo@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

Toxocaríase é uma zoonose parasitária mundialmente distribuída que causa prejuízos à saúde pública e, ainda assim é considerada uma doença negligenciada. É transmitida pelo parasita *Toxocara canis* e *Toxocara cati* e, pode acometer humanos e animais; se caracteriza pela migração da larva em diversos tecidos do hospedeiro, o que dificulta o processo de diagnóstico da parasitose (MAGALHÃES, 2014).

Embora acredita-se que o *T. canis* seja o principal patógeno relacionado a toxocaríase, sendo o mais estudado para o diagnóstico da enfermidade, existem evidências de que os seres humanos possam ser infectados por larvas de *T. cati* (FISHER, 2003).

O diagnóstico da doença é baseado em resultados laboratoriais por ELISA e confirmação por *Western blotting* utilizando os antígenos obtidos a partir do cultivo da larva, tornando tal diagnóstico um processo laborioso, além de carecer de um total de 60 dias para a produção devido à necessidade de cultivar *in vitro* as larvas do parasita (MOREIRA, 2014).

Neste contexto, como uma alternativa à produção nativa de *Toxocara spp.* surge a utilização de técnicas de biologia molecular, como a produção de antígenos recombinantes, tornando o diagnóstico rápido e simples quanto a produção de antígenos. As principais proteínas pertencentes ao antígeno TES (rTES-26, rTES-32 e rTES-120) são glicosiladas, antigênicas e, altamente específicas para *Toxocara spp.* (98,3%), diminuindo as reações cruzadas com outras parasitoses, tornando-as viáveis para utilização como antígeno em imunodiagnóstico da toxocaríase (ROLDÁN & ESPINOSA, 2009).

O presente estudo teve como objetivo investigar a reatividade das proteínas TES-30 e TES-120, produzidas em *Escherichia coli*, com soros de camundongos, infectados experimentalmente por *T. canis* ou *T. cati*.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Expressão e caracterização das proteínas em *E. coli*

Os genes sintéticos *tes-30* e *tes-120* foram clonados em vetor de expressão pAE e utilizados para transformar a cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star. As cepas transformadas foram transferidas para meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL), e deixado sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 18 h. Após esse período, o pré-inóculo foi transferido para um inóculo com meio LB contendo o

mesmo antibiótico. Quando a  $D.O_{600}$  chegou entre 0,6 a 0,8, a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,5 mM. As culturas foram incubadas por mais 3 horas a 37° C sob agitação de 200 rpm.

Após a identificação da expressão das proteínas recombinantes através de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, foi realizada a expressão em maior escala. Os clones recombinantes propagados na cepa Star foram cultivados em 50 mL de LB com ampicilina nas mesmas condições já citadas. Em seguida, os cultivos foram transferidos para um volume maior de 500 mL de LB com o mesmo antibiótico, e foi induzido quando alcançou a  $D.O_{600nm} = 0,6 - 0,8$ .

Os *pellets* celulares, obtidos através de centrifugação (16.000 g; 4°C; 10 min) foram suspensos em 20 mL de tampão Akta Wash (0,234% de  $NaH_2PO_4$ , 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) com 100  $\mu$ g/mL de lisozima e incubados por 2 h a 4 °C. Posteriormente foram submetidos a rompimentos por ondas de ultrassom (sonicação) em sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e então centrifugados novamente.

O sobrenadante foi armazenado e foi realizada a lavagem do *pellet* com PBS por três vezes. Os precipitados celulares finais foram suspensos em tampão Akta Wash com Uréia (Akta Wash + uréia 6 M), e deixados sob agitação por 48 h a 4°C. O material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado. Os sobrenadantes obtidos foram avaliados em SDS-PAGE 12%.

As frações contendo as proteínas rTES-30 e rTES-120 foram purificadas por cromatografia de afinidade com Níquel ( $Ni^{+2}$ ), utilizando colunas de gravidade His GraviTrap (GE Healthcare) e verificadas por SDS-PAGE 12% quanto à presença das proteínas recombinantes. Essas frações foram quantificadas com o *kit BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e caracterizadas por SDS-PAGE e *Western blotting*.

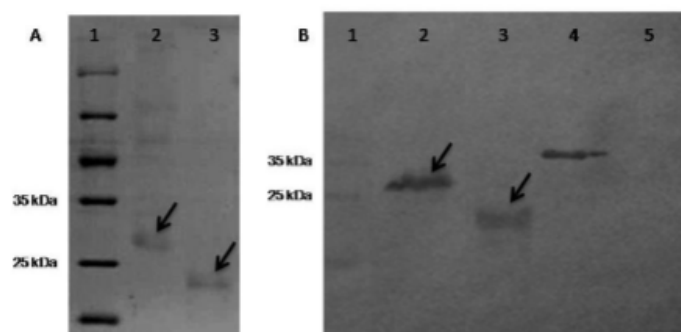
## 2.2 Soro de camundongos e ELISA

Soros de 15 camundongos previamente infectados por *Toxocara canis* (n=8) e *Toxocara cati* (n=7), pertencentes a soroteca do Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da FURG, foram utilizados para a análise de sensibilidade e especificidade das proteínas recombinantes. Os camundongos foram infectados com doses de 100 ovos infecciosos de *T. canis* e *T. cati*. Em seguida, foram coletadas as amostras destes animais nos dias 15, 30 e 45.

Para o imunodiagnóstico da toxocaríase foi utilizada a metodologia de ELISA indireto, no qual a concentração das proteínas utilizadas por poço foi de 50 ng, a diluição em PBS-T do soro utilizada foi de 1: 160, o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase utilizado foi diluído em PBS-T na concentração de 1: 5000 e a leitura foi realizada na densidade óptica de 450 nm. Posteriormente, foi realizada a análise estatística utilizado ANOVA de duas vidas no *software* GraphPad.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

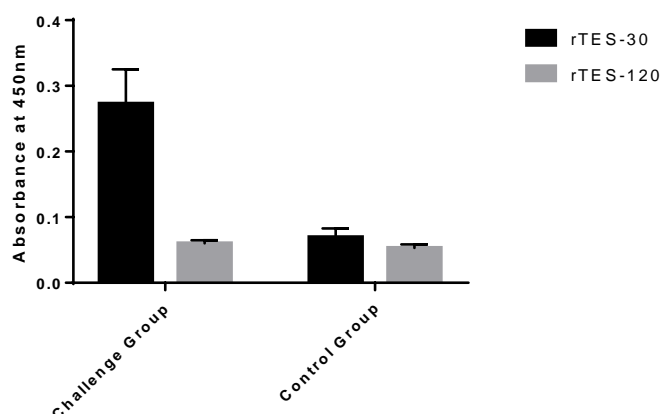
A confirmação da expressão dos antígenos foi analisada através de SDS-PAGE e *Western blotting* frente a anticorpo monoclonal anti-His (Sigma Aldrich) na concentração de 1:6000 (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Avaliação da expressão das proteínas rTES-30 e rTES-120 em SDS-PAGE 12%. 1- Marcador de massa molecular (*Thermo Scientific*); 2- rTES-120; 3- rTES-30. (B) Caracterização das proteínas rTES-30 e rTES-120 por *Western blotting* frente ao anticorpo monoclonal anti-6xHis. 1- Marcador pré-corado (*Thermo Scientific*); 2- rTES-120; 3- rTES-30; 4- Controle positivo rSeM; 5- Controle negativo

Os resultados obtidos demonstram a presença de uma banda cuja massa molecular é de aproximadamente 25 KDa correspondente a rTES-30, e outra banda um pouco acima dos 25 kDa referente a rTES-120.

Quanto à reatividade por ELISA indireto, o rTES-30 teve soropositividade na maioria das amostras, excluindo um dos animais que teve sua amostra coletada no 15º dia após a inoculação. Já por sua vez, o rTES-120 teve uma reatividade quase nula (Figura 2).



**Figura 2.** Comparação das absorbâncias médias obtidas no ELISA entre camundongos infectadas por *T. canis* (n = 8) e *T. cati* (n = 7) usando as proteínas recombinantes rTES-30 e rTES-120.

Embora a alta sensibilidade da rTES-30 fosse esperada, como já descrito na literatura, visto que é uma proteína imunogênica. A baixa sensibilidade (Tabela 1) da rTES-120 foi inesperada, tendo em vista que o camundongo é modelo animal para estudos da toxocaríase e estudos em humanos apresentarem uma alta sensibilidade (MOHAMAD, 2009).

**Tabela 1.** Potencial de imunodiagnóstico de rTES-30 e rTES-120 em camundongos infectados por *T. canis* (n = 8) e *T. cati* (n = 7)

|                            | rTES-30 | rTES-120 |
|----------------------------|---------|----------|
| <b>Sensibilidade</b>       | 83.3%   | 16.7%    |
| <b>Especificidade</b>      | 85.7%   | 85.7%    |
| <b>Cut-off<sup>a</sup></b> | 0.18    | 0,09     |

<sup>a</sup>Cut-off calculado pela média dos negativos + 2(SD)

Não houve diferença estatística entre a sensibilidade e especificidade no diagnóstico de camundongos infectados por *T. canis* ou *T. cati*. A única alternativa de diagnóstico diferencial das espécies continua sendo a biópsia; técnica inviável em humanos, gerando incerteza sobre a soroprevalência e potenciais riscos associados a infecções pelas espécies *T. canis* ou *T. cati* (FISHER, 2003).

Estudos que abordam o uso de proteínas recombinantes no diagnóstico da toxocaríase utilizam rTES-30 e rTES-120 como antígenos de alto potencial. Enquanto amostras humanas mostraram um potencial como resposta para rTES-30 e rTES-120, conforme já descrito na literatura (MOHAMAD, 2009), no camundongo, o rTES-120 não mostrou potencial para ser usado como marcador da infecção.

#### 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que não foi possível o diagnóstico diferencial entre as espécies *T. canis* e *T. cati*, com os atuais antígenos recombinantes utilizados pela comunidade científica.

Ademais, o uso de uma proteína específica para o diagnóstico de infecção por *Toxocara spp.* requer cautela, uma vez que a proteína pode induzir a resposta imune em uma espécie, mas não em outras.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MAGALHÃES, C. G. Antígeno TES recombinante: uma alternativa ao diagnóstico da toxocaríase humana. 2014. 1- 47. **Trabalho de conclusão de curso.** Universidade Federal de Pelotas. Pelotas

FISHER, M. ***Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent.** *Trends in Parasitology*. v. 19, p. 167–170, 2003.

ROLDÁN, W. H.; ESPINOSA, Y. A. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocaríasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, n. 3, p. 411-418, 2009.

MOHAMAD, S, et al. **"Development and evaluation of a sensitive and specific assay for diagnosis of human toxocaríasis by use of three recombinant antigens (TES-26, TES-30USM, and TES-120)."** *Journal of clinical microbiology* 47.6 (2009): 1712-1717.