

## AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR PARA IDENTIFCAÇÃO DE DNA DE *Toxocara canis* NO ENCÉFALO DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

MICAELE QUINTANA DE MOURA<sup>1</sup>; MÁRCIA RAQUEL PEGORATO DE MACEDO<sup>2</sup>; WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO<sup>2</sup>; LUCIANA FARIAS DA COSTA ÁVILA<sup>3</sup>; MARIA ELISABETH AIRES BERNE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [micaele.q.m@live.com](mailto:micaele.q.m@live.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - [mrpmbio@gmail.com](mailto:mrpmbio@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio grande - [lavila@furg.br](mailto:lavila@furg.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [bernemea@gmail.com](mailto:bernemea@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma doença de caráter zoonótico, que tem como principal agente etiológico o *Toxocara canis*, mas podendo também ser ocasionada por *Toxocara cati* (HOSSACK *et al.*, 2008). Esses nematódeos possuem como hospedeiros definitivos cães e gatos, nos quais as formas adultas se localizam no intestino delgado (DESPOMMIER, 2003). Nos hospedeiros não preferenciais, como o homem, a forma larval desse parasito se mantém em migração nos tecidos, ocasionando diversas síndromes e quadros clínicos, podendo acometer uma grande variedade de tecidos, destacando-se as vísceras, olhos e encéfalo. (DESPOMMIER, 2003).

O diagnóstico da toxocaríase é difícil devido à ausência de sintomas específicos e a variedade de manifestações clínicas (MOREIRA *et al.*, 2014). Atualmente, as técnicas sorológicas são as mais utilizadas para o diagnóstico laboratorial da toxocaríase, sendo o teste de maior especificidade o ELISA indireto, que utiliza antígenos de excreção e secreção de larvas L3 (TES) (DESHAYES *et al.*, 2016). No entanto, os testes de ELISA disponíveis utilizando o TES bruto não são capazes de diferenciar as duas espécies agentes da toxocaríase (ZIBAEI *et al.*, 2016). Além disso também podem ocorrer reações cruzadas entre *Toxocara* spp. e outros helmintos, como por exemplo *Ascaris* spp. e *Fasciola hepatica* (ROMASANTA *et al.*, 2003).

A identificação, através de técnicas moleculares, de *Toxocara* spp. e sua diferenciação de outras espécies de ascarídeos, que também podem realizar migração de larvas nos tecidos, tem contribuído para o estudo do diagnóstico e controle desses parasitos (GASSER *et al.*, 2013; ZIBAEI *et al.*, 2013).

Nesse contexto, o presente estudo buscou identificar fragmentos de DNA de *T. canis*, no encéfalo e no sangue de camundongos experimentalmente infectados.

### 2. METODOLOGIA

Os ovos de *T. canis* foram coletados e incubados conforme AVILA *et al* (2011), e a inoculação de 1500 ovos foi realizada através de gavagem por sonda gástrica em 9 camundongos que foram divididos em 2 grupos: G1, submetidos à eutanásia 48 h após a inoculação dos ovos (5 animais) e G2, submetidos à eutanásia 30 dias após a inoculação dos ovos (4 animais). Foi também mantido um grupo controle (G3) de 2 animais, que não foram inoculados (controle negativo).

Os animais do Grupo G1 tiveram sangue total coletado com EDTA no momento anterior à eutanásia, no do Grupo G2 e grupo controle. As coletas se

deram nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após infecção, com EDTA (sangue total) e sem EDTA (soro). As amostras de soro foram utilizadas para teste de ELISA e as de sangue total de todos os grupos para avaliação molecular (PCR).

Durante a necropsia, foram coletados os encéfalos, que foram individualmente macerados e fracionados em quintuplicatas de 20mg, para posterior extração de DNA. O restante do órgão foi submetido à digestão tecidual para contagem do número de larvas de *T. canis* (WANG & LUO, 1998).

As extrações de DNA foram realizadas através do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega®), e para amplificação de DNA foram utilizados os primers desenhados por JACOBS et al., (1997). A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µL: 25 µL Master Mix 2X (Promega®), 1,5 de cada primer (20 µM), 300µg de DNA e submetidas a temperaturas de 95°C/5min; 35 ciclos de 95 °C/30s; 55°C/30s; 72 °C/30s; e 72 °C/ 7 min.

Foram utilizados como controle positivo DNA extraído de pool de 500 larvas de *T. canis* e, como controle negativo, DNA do encéfalo e sangue de camundongo não infectado. A eletroforese foi realizada com volume final de 6µL em gel de agarose a 2% e observado em transluminador de luz UV. O órgão foi considerado positivo para infecção por *T. canis*, quando observado amplicon em ao menos uma das quintuplicatas. As amostras positivas foram purificadas utilizando o Kit comercial GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit e enviadas para empresa especializada em sequenciamento genético Macrogen®.

A pesquisar de IgG (Anti-*Toxocara*), foi realizado individualmente nos animais do Grupo G2 e controles negativos, através do teste TES-ELISA indireto conforme AVILA et al., (2011).

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

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível observar a amplificação do DNA de *T. canis* no controle positivo (500 larvas) e a ausência de amplificação nos controles negativos. Estes resultados foram confirmados através do sequenciamento genético.

Conforme pode-se observar na tabela 1, foi possível detectar DNA de *T. canis* no encéfalo de três camundongos do grupo G1, destes, em um, a recuperação de larvas no tecido foi zero, e nos outros dois foi de apenas uma larva em cada. Nos dois animais nos quais não foi visualizada amplificação (negativos na PCR), também não foram recuperadas larvas no respectivo tecido, importante salientar que a infecção foi confirmada nesses animais através do teste de ELISA. No grupo G2 todos os animais tiveram a infecção do encéfalo ratificada pela técnica de PCR (tabela 1). No entanto, não houve amplificação em nenhuma das amostras de sangue nos animais dos dois grupos (G1 e G2).

Tabela 1: Amplificação do DNA de *Toxocara canis* no encéfalo e número de larvas recuperadas em camundongo experimentalmente infectados.

	Resultado PCR / N° de Larvas recuperadas								
	G1 (48 h após inoculação)					G2 (30 dias após inoculação)			
Identificação Animais	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4
Encéfalo	+ / 1	+ / 0	- / 0	- / 0	+ / 1	+ / 107	+ / 157	+ / 86	+ / 20

Este é o primeiro relato de identificação de *T. canis* por biologia molecular no encéfalo de camundongos experimentalmente infectados. Entretanto, ZIBAEI el

al.; (2017) identificaram larvas de *Toxocara* spp. no encéfalo de frangos naturalmente infectados, no entanto, neste estudo as larvas foram previamente isoladas do tecido para subsequente identificação molecular. No presente estudo a busca pelo DNA do parasito ocorreu junto ao tecido encefálico do animal, dispensando etapa anterior a Extração de DNA.

Não foi possível identificar DNA de *T. canis* no sangue total dos animais, ao contrário do que já foi descrito com outros parasitos, como *Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens* em amostras de sangue de cães (ALBONICO et al., 2013), acreditasse que a diferença nos resultados seja devido ao ciclo de vida desses parasitos, uma vez que o *T. canis* não possui uma fase de vida livre no sangue, alcançando a circulação apenas na ocasião de migração pelos tecidos (DESPOMMIER, 2003).

Neste estudo observou-se a confirmação da infecção de todos os animais por técnica molecular em apenas 48 h após a inoculação, enquanto no teste de ELISA foram necessários 14 dias para ocorrer a conversão da sorologia (figura 1). Esse dado é corroborado por ZIBAEI et al., (2013), que obtiveram melhores resultados no diagnóstico da LMO em gerbils experimentalmente infectados, por PCR, quando comparadas a técnicas sorológicas.

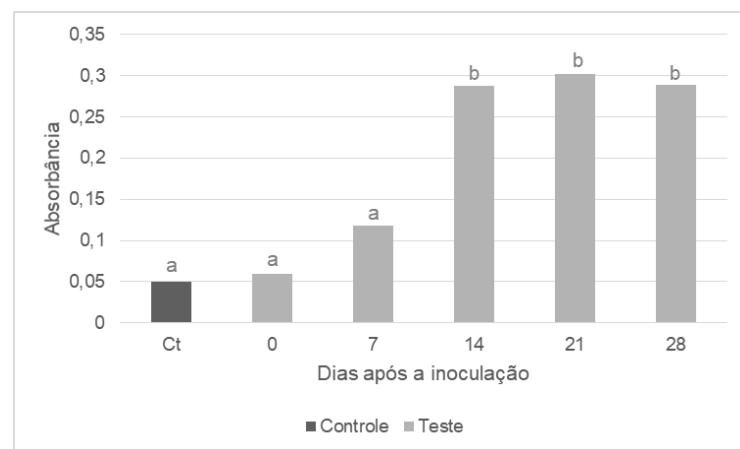


Figura 1: Cinética da produção de IgG contra *Toxocara canis* em camundongos experimentalmente inoculados com 1500 ovos de *T. canis*. Letras diferentes indicam diferença significativa (<0,05%). (Ct animais não infectados).

Outra vantagem das técnicas moleculares é a possibilidade de identificar a espécies de *Toxocara* envolvida (BORECKA et al.; 2004), uma vez que o TES-ELISA não é capaz de diferenciar as duas espécies (ZIBAEI et al., 2016). Embora a maioria dos registros em humanos sejam referidos por ação de *T. canis*, há também casos relacionados ao *T. cati* (HOSSACK et al., 2008) cuja importância na toxocariase pode estar subestimada, devido as dificuldades em diferenciar as formas larvais de *T. cati* das de *T. canis* (FISHER et al., 2003).

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo mostra a capacidade da técnica de PCR para identificação de *T. canis* no cérebro de camundongos infectados experimentalmente, sendo descrito aqui, o primeiro relato do diagnóstico molecular no cérebro de camundongos infectados por esse nematódeo. Esses resultados mostram que é possível a identificação de *T. canis* em tecidos animais por técnicas de biologia molecular, o que pode auxiliar no diagnóstico da toxocariase, bem como de novos estudos epidemiológicas no ambiente e em animais paratênicos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AVILA, L. F. C.; FONSECA, J. S. V.; DUTRA, G. F.; TELMO, P. L.; SILVA, A. M. W. A.; BERNE, M .E. A.; SILVA, P. E. A.; CONCEIÇÃO, F. R.; SCAINI, C. J. Evaluation of the immunosuppressive effect of cyclophosphamide and dexamethasone. **Parasitology Research**, 2011.
- BORECKA, A. Differentiation of *Toxocara* spp. eggs isolated from the soil by the PCR-linked RFLP method. **Helminthologia**, v. 41, n. 4, p. 185-187, 2004.
- DESHAYES, S.; BONHOMME, J.; BLANCHARDIÈRE, A. D. L.; Neurotoxocariasis: a systematic literature review. **Infection**, v. 44, n. 5, p 565–574, 2016.
- DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical aspects, epidemiology, medical ecology and molecular aspects. **Clinical MicrobiologyReviews**, v.16, n.2, p.265-272, 2003.
- FISHER, M. *Toxocara cati*: na underestimated zoonotic agent. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 167-170, 2003.
- GASSER, R. B. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 353-364, 2013.
- HOSSACK, 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.
- JACOBS, D.E., ZHU, X., GASSER, R.B., CHILTON, N.B. PCR-based methods for identification of potentially zoonotic ascaridoid parasites of the dog fox and cat. **Acta Tropica**, v. 68, p. 191–200, 1997.
- MOREIRA, G. M. S. G.; TELMO, P. L.; MENDONÇA, M.; MOREIRA, A. N.; McBRIDE, A. J. A.; SCAINI, C. J.; CONCEIÇÃO, F. R. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 9, 2014.
- ROMASANTA, A.; ROMERO, J. L.; ARIAS, M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; LÓPEZ, C.; SUÁREZ, J. L.; DÍAZ, P.; DÍEZ-BAÑOS, P.; MORRONDO, P.; PAZ-SILVA, A. Diagnosis of Parasitic Zoonoses by Immunoenzymatic Assays—Analysis of Cross-Reactivity Among the Excretory/Secretory Antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. **Immunological Investigations**, v. 32, n. 3, p. 131–142, 2003.
- WANG, G. X.; LUO, Z. J. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, 1998.
- ZIBAEI, M.; SADJJADI, S. M. Trend of toxocariasis in Iran: a review on human and animal dimensions. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz University, v. 18, n. 4, p. 233-242, 2017.
- ZIBAEI, M.; SADJJADI, S. M.; SARKARI, B.; UGA, S. Evaluation of *Toxocara cati* Excretory–Secretory Larval Antigens in Serodiagnosis of Human Toxocariasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, p. 248–253, 2016.
- 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 *Toxocaracati* in Mongolian Gerbils and Wistar Rats. **BioMed Research International**, 2013.
- ALBONICO, F.; LOIACONO, M.; GIOIA, G.; GENCHI, C.; GENCHI, M., MORTARIO, M. Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolutin melting analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p.128–132, 2013.