

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS TES-30 E TES-120 RECOMBINANTES EM IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA

EMILI GRIEP¹; RAFAEL DONASSOLO¹; GIULI MARQUES¹; LUCAS MOREIRA DOS SANTOS¹; CARLOS JAMES SCAINI²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Universidade Federal de Pelotas – emiliigriep@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – cjscaini@ufrgs.br

³Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

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

O diagnóstico da doença é baseado em resultados laboratoriais obtidos por testes de ELISA e confirmação por *Western blotting* utilizando os抗ígenos obtidos a partir do cultivo da larva, o que torna o diagnóstico um processo laborioso, além de levar 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抗ígenos de *Toxocara spp.*, surge a utilização de técnicas, como a de produção de抗ígenos de forma heteróloga, o que pode possibilitar a elaboração de um diagnóstico mais rápido e simples quanto a produção de抗ígenos. As principais proteínas pertencentes ao抗ígeno TES (rTES-26, rTES-32 e rTES-120) são glicosiladas, antigenicas e, altamente específicas para *Toxocara spp.* (98,3%), diminuindo as reações cruzadas com outras parasitoses, tornando-as viáveis para utilização como抗ígeno no imunodiagnóstico da toxocaríase (ROLDÁN & ESPINOSA, 2009).

Na literatura, um estudo testou a hipótese de utilizar as proteínas recombinantes TES 30 e TES 120 para diagnóstico de toxocaríase, e junto de um terceiro抗ígeno TES, alcançou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 92% em um teste de ELISA frente a IgG4 (MOHAMAD; AZMI; NOORDIN, 2009).

O objetivo deste trabalho foi testar a sensibilidade e especificidade de dois抗ígenos, TES-30 e TES-120 recombinantes frente a soros humanos, como uma alternativa ao diagnóstico de toxocaríase.

2. METODOLOGIA

2.1 Expressão das proteínas em *Escherichia coli*

Os genes sintéticos TES-30 e TES-120 foram clonados em vetor de expressão pAE. Os clones recombinantes propagados na cepa Star foram cultivados em 50 mL de LB com ampicilina sob agitação de 200 rpm, a 37 °C por 18 h. Após os cultivos foram transferidos para o volume de 500 mL de LB com o mesmo antibiótico. Ao alcançar a $D.O_{600nm} = 0,6 - 0,8$ o cultivo foi induzido com 500 mL de IPTG na concentração 0,5 mM. Os pellets celulares foram suspensos em 20 mL de tampão Akta Wash (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole) com 100 µg/mL de lisozima e incubados por 2 h a 4

ºC. Posteriormente as células foram rompidas por ondas de ultrassom (sonicação) em sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e então centrifugadas novamente. 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 4ºC. O material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado. As frações contendo as proteínas rTES-30 e rTES-120 foram purificadas por cromatografia de afinidade com Níquel (Ni+2), utilizando colunas de cromatografia HisTrap (GE Healthcare) e verificadas por SDS-PAGE 12% e *Western blotting* quanto à presença das proteínas recombinantes.

2.2 Soros humanos e ELISA

Os soros para a elaboração do teste foram adquiridos de diferentes experimentos. No experimento 1, foram coletados soro de 48 crianças entre 2-8 anos atendidas no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio Grande. No experimento 2, o soro foi coletado de 42 colaboradores do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande e da Universidade Federal de Pelotas. Nos experimentos 1 e 2 os pacientes foram diagnosticados de acordo com dados epidemiológicos e exames laboratoriais, totalizando 22 soros positivos e 26 negativos para infecção por *Toxocara* spp. no experimento 1 e 23 soros positivos e 19 negativos para infecção por *Toxocara* spp. no experimento 2.

Para o ELISA foi utilizado placa de microtitulação de 96 poços de fundo chato (Nunc Immuno Maxisorp, Thermo Fischer Scientific, EUA), sensibilizadas com 50 ng de cada antígeno recombinante em tampão bicarbonato 0,02 M, pH 9.6 e incubadas a 4 °C, 16 horas. As placas foram lavadas com PBS-T, para remover o antígeno não adsorvido. Após, cada poço foi bloqueado com solução de PBS-T a 5% de leite em pó durante 1 h a 37 °C. As placas foram novamente lavadas com a mesma solução descrita anteriormente, seguido pela adição das amostras de soro (100 uL, 1: 150 em PBS-T) em duplicata e incubadas a 37 °C durante 1 h.

Após a etapa de lavagem, o anticorpo monoclonal anti-IgG humano (Thermo Fisher Scientific, EUA) conjugado com a enzima peroxidase foi adicionado a uma diluição otimizada (1: 5000) em PBS-T. Ou ainda foram utilizados IgG2 anti-humano de camundongo (Sigma Aldrich, EUA) em uma diluição otimizada (1: 2500) em PBS-T, ou IgG4 anti-humano de camundongo (Sigma Aldrich, EUA) foram adicionados em uma diluição otimizada (1: 2500) em PBS-T, seguido (no caso de IgG2 e IgG4) de anticorpos IgG anti-murino conjugados com peroxidase (Thermo Fisher Scientific, USA) e incubadas a 37 durante 1 hora. Após a lavagem final, foi adicionado o substrato de revelação com o cromógeno OPD (dicloridrato de o-fenilenodiamina). A D.O. foi medida após 30 min, no comprimento de onda de 450 nm com espectrofotômetro. O valor de corte foi baseado nos resultados de uma análise estatística ROC através do software GraphPad Prism.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

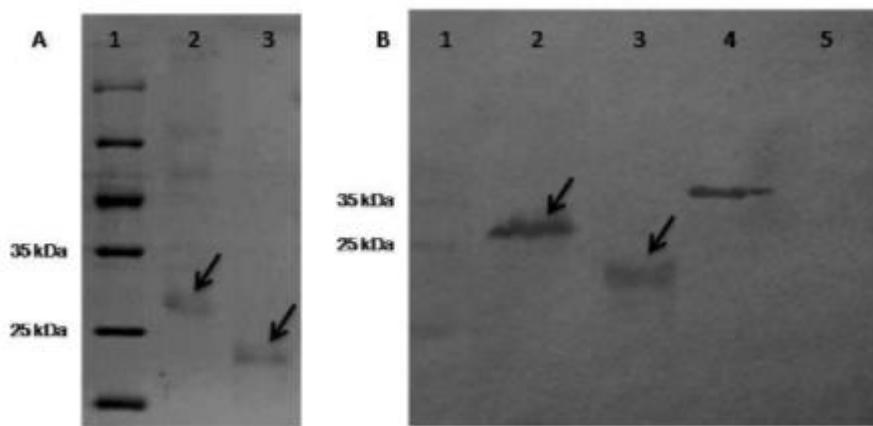


Figura 1. (A) Avaliação da expressão das proteínas rTES-30 e rTES-120 em SDS-PAGE 12%. 1- Marcador de massa molecular (*Thermo Scientific*); 2- rTES-120; 3- rTES-30. (B) Caracterização das proteínas rTES-30 e rTES-120 por *Western blotting* frente ao anticorpo monoclonal anti-6xHis. 1- Marcador pré-corado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

A tabela 2 mostra sensibilidade geral e a especificidade das proteínas recombinantes com os soros humanos.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade para cada proteína e anticorpo após análise ROC.

Proteína/Anticorpo	Amostras positivas (Sensibilidade)	Amostras Negativas (Especificidade)
rTES-30/IgG	38/45 (84.4%)	45/45 (100%)
rTES-30/IgG2	4/45 (8.9%)	40/45 (88.9%)
rTES-30/IgG4	10/45 (22.2%)	44/45 (97.8%)
rTES-120/IgG	34/45 (75.6%)	45/45 (100%)
rTES-120/IgG2	6/45 (13.3%)	43/45 (95.6%)
rTES-120/IgG4	23/45 (51.1%)	44/45 (97.8%)

De uma maneira geral, os resultados do nosso estudo discordaram dos estudos de Mohamad et al. (2009) e Watthanakulpanich et al. (2008), que mostraram maior sensibilidade usando um conjunto de proteínas para diagnosticar a infecção por *Toxocara* spp., enquanto que em nosso estudo o uso de apenas uma proteína (rTES-30) se torna eficiente sem afetar a sensibilidade e alcançando uma especificidade de 100% com anti-IgG, reduzindo ainda mais o custo de produção associado. Outra diferença entre os estudos é a menor sensibilidade de IgG4 e IgG2, considerados como os anticorpos mais sensíveis e específicos para a toxocaríase. Essa discrepância poderia ser uma diferença populacional pois nosso estudo foi realizado no Brasil. Além disso,

Watthanakulpanich et al. (2008) utilizaram o TES nativo, quando o IgG2 foi o mais sensível e específico.

4. CONCLUSÕES

Como uma ferramenta de estudos epidemiológicos e diagnóstico de toxocariase em humanos nosso estudo pode trazer o uso de rTES-30 usando IgG total como anticorpo primário em um ensaio ELISA indireto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

MOHAMAD, S, et al. 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 (2009): 1712-1717.

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

WATTHANAKULPANICH, D.; SMITH H. V.; HOBBS, G.; WHALLEY A. J.; BILLINGTON, D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. **Acta Trop.** 2008; 106(2):90–5.