

RELAÇÃO ANTIGÊNICA ENTRE *Ascaris* sp. E *Toxocara canis*

C.J. SCAINI*
M.E.A. BERNE**

RESUMO

Os parasitos de distribuição cosmopolita *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, e *Toxocara canis* são relacionados filogeneticamente. Este trabalho tem como objetivo identificar componentes moleculares envolvidos na reatividade cruzada entre *T. canis* e *Ascaris* sp. no diagnóstico da larva migrans visceral, utilizando anticorpos monoclonais (AcMos) anti-*T. canis*. No ensaio imunoenzimático e no *Western blotting*, os AcMos IgG1 e IgM reconheceram bandas do antígeno somático de *A. suum*. Esses componentes foram bandas de 29, 48, 65 e 72 kDa, as quais representam provavelmente homologia entre *Ascaris* sp. e *T. canis*.

PALAVRAS-CHAVES: *Toxocara canis*, *Ascaris*, larva migrans visceral, anticorpos monoclonais, reatividade cruzada.

ABSTRACT

The cosmopolitan parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis* are closely related phylogenetically. The objective of this work was to show the cross-reactions between *T. canis* and *Ascaris* sp. in the diagnosis of visceral larva migrans using monoclonal antibodies (MAbs) against *T. canis*. The enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting, showed that IgG1 and IgM MAbs present cross-reactions with *A. suum* somatic antigen. The main cross-reactive components were bands with molecular weight of 29, 48, 65 e 72 kDa, which are probably homologous between *Ascaris* sp. and *T. canis*.

KEY-WORDS: *Toxocara canis*, *Ascaris*, visceral larva migrans, monoclonal antibodies, cross-reaction.

1 – INTRODUÇÃO

Os relatos de experiências clínicas e inquéritos sorológicos têm contribuído para o reconhecimento da importância da síndrome da larva migrans visceral (LMV). Estudo realizado em Esteio, RS, revelou soroprevalência de 56,4% (260/461) em pacientes de diferentes faixas etárias¹¹.

O ensaio imunoenzimático (ELISA), associado ao antígeno de excreção e secreção de *Toxocara canis* (TES), é atualmente empregado

* Setor de Parasitologia, Departamento de Patologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Área Acadêmica HU, Rua General Osório, S/N, CEP: 96.200-400 Rio Grande, RS, Brasil. E-mail: dpacjs@furg.br

** Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

como técnica padrão no imunodiagnóstico dessa doença. Esse antígeno apresenta maior sensibilidade do que os antígenos somáticos, sendo composto por cinco bandas principais (32, 55, 70, 120 e 400 kDa), e alguns componentes menores⁸. O antígeno TES é rico em carboidratos, sendo que os principais produtos são N-acetilgalactosamina e galactose. Também apresenta manose, N-acetilglucosamina, glicose, fucose, xilose e arabitol¹⁰.

Embora a utilização do antígeno TES tenha melhorado a especificidade dos testes de diagnóstico, ainda ocorrem reações cruzadas com outros parasitos, principalmente com o gênero *Ascaris*⁶. Diante disso, as amostras de soros dos pacientes com suspeita clínica de LMV são adsorvidas com antígeno somático de *Ascaris suum* para diminuir a ocorrência de reatividade cruzada. A utilização do extrato somático do *A. suum* deve-se à similaridade antigênica com *A. lumbricoides*, sendo fácil a obtenção das formas adultas dessa espécie nos matadouros³.

Para que se possa desenvolver métodos de diagnóstico com maior especificidade do que o ELISA-TES, empregado atualmente como padrão, é importante estudar a homologia entre *Toxocara canis* e *Ascaris* sp., assim como demonstrar a reatividade cruzada entre esses parasitos.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Produção do antígeno somático de *Ascaris suum* (AgSoAs)

A produção do antígeno foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Berne¹. Exemplos fêmeas de *Ascaris suum*, colhidos do intestino delgado de suínos, foram lavados em solução salina isotônica com tampão fosfato (PBS) 0,15 M, pH 7,2, picados e macerados com tampão de extração (Tris 10mM – trihidroximetilaminometano, timerosol 1:100 e água destilada), contendo inibidores de proteases (EDTA 1mM – ácido etilenodiaminotetraacético, sal dissódico; CHAPS 5mM- 3[3-cloroamidopropil – dimetil – amônio] 1-propanosulfonato; PMSF 1mM – fluoreto de fenilmetilsulfonila). O macerado foi submetido à ultrassonicação (Ultrasonic Homogenizer) durante um minuto a 40 hertz, por quatro vezes, com intervalos de um minuto, e, a seguir, foi centrifugado a 20.000 g durante 60 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi dialisado em PBS 0,15M, pH 7,2, por 24 horas, a 4°C, e posteriormente centrifugado a 15.000 g, por 30 minutos, a 4°C. O material foi estocado em alíquotas a -70°C, constituindo-se no AgSoAs. A concentração protéica do antígeno foi determinada pelo

método de Bradford².

2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para promover a separação das frações protéicas do antígeno somático de *Ascaris suum* (AgSoAs), foi utilizado o gel de corrida, na concentração de 12,5% em tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, e, para o empilhamento, foi usado o gel na concentração de 5% em tampão Tris/HCl 0,125 M, pH 6,8. Em cada canaleta do gel, foram adicionados 10 µg do AgSoAs. A corrida eletroforética foi realizada sob condições redutoras, em voltagem constante de 150V. Os pesos moleculares das bandas foram calculados a partir do logaritmo do peso molecular e da migração de cada marcador de peso molecular (Pharmacia – LMW).

2.3 – Anticorpos Monoclonais (AcMos)

Visando demonstrar reatividade cruzada entre o *Toxocara canis* e *Ascaris* sp., foi utilizado o AgSoAs, através do ensaio imunoenzimático (ELISA) e do *Western blotting*, frente a um anticorpo monoclonal IgM (AcMo1) e a um IgG1 (AcMo 23) anti-*T. canis*¹². Os anticorpos monoclonais foram produzidos a partir da fusão entre células de mieloma da linhagem SP₂/0 e linfócitos de baço de camundongo BALB/c imunizado com larvas de *T. canis* e antígeno TES⁹.

2.4 – ELISA-AgSoAs frente a anticorpos monoclonais anti-*T. canis*

Uma placa de ELISA, de fundo chato (Nunc), foi sensibilizada com AgSoAs (2 µg/ml) em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6-9,8, por três horas, a 37°C, e o bloqueio foi feito com PBS-caseína a 2%, durante uma hora, a 4°C. Os sobrenadantes de dois hibridomas contendo anticorpos monoclonais anti-*T. canis*, os controles (1:100), e, posteriormente, o conjugado polivalente anti-camundongo (Dako), diluído (1:2.000) em PBS pH 7,2, contendo Tween-20 a 0,05%, foram incubados por 45 minutos, a 37°C. Foi realizada leitura (450 nm) 15 minutos após a adição da ortofenilenodiamina e peróxido de hidrogênio a 0,1%.

2.5 – Western blotting-AgSoAs frente a anticorpos monoclonais anti-*T. canis*

Após eletroforese e eletrotransferência das frações protéicas do AgSoAs para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad – 0,45 µm), foi feito

bloqueio dos sítios livres com TBS (Tris 20mM, cloreto de sódio 200mM em água destilada, pH 7,4), acrescido de leite desnatado a 5%, durante 18 horas, a 4°C. Após, os AcMos, o soro de camundongo controle negativo e o soro controle positivo foram incubados por duas horas, à temperatura ambiente, seguido da incubação do conjugado (1:1.000) polivalente anti-camundongo (Dako). A membrana foi incubada com 3,3'diaminobenzidine (Sigma), sendo a reação interrompida com água destilada quando apareceram as bandas.

3 – RESULTADOS

A reatividade cruzada dos anticorpos monoclonais IgG1 e IgM anti-*T. canis*, frente ao antígeno somático de *Ascaris suum*, foi detectada no ELISA, com as absorvâncias de 0,379 e 0,264, respectivamente.

Na Figura 1, pode ser observada a separação das frações protéicas do AgSoAs no SDS-PAGE a 12,5%, sendo visualizadas bandas entre 19 e 109 kDa. Através do *Western blotting*, o AcMo 1 reconheceu bandas de 29, 48, 65 e 72 kDa do AgSoAs, enquanto o AcMo 2 reconheceu bandas de 48, 65 e 72 kDa. O soro controle negativo não demonstrou reatividade (Figura 1). O soro do camundongo controle positivo (utilizado na fusão celular) reagiu com bandas entre 29 e 90 kDa.

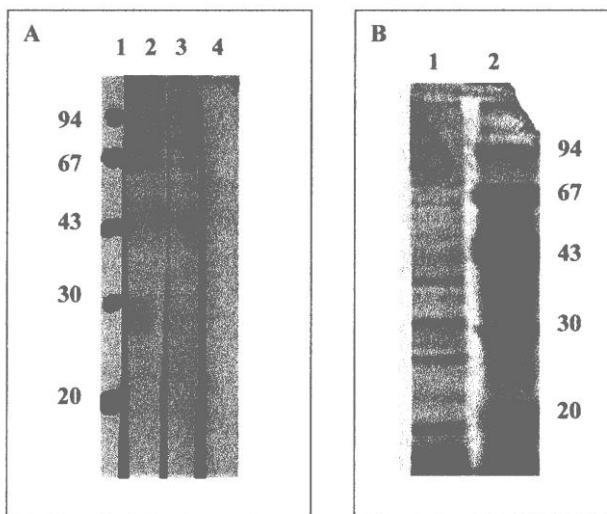


FIGURA 1 – A: Reatividade dos AcMos anti-*T. canis* frente ao AgSoAs, através do *Western blotting*, AcMo1 (2); AcMo2 (3); soro de camundongo controle negativo (4); padrão de peso molecular - kDa (Pharmacia – LMW) (1). B: Perfil eletroforético do AgSoAs em SDS-PAGE (1); padrão de peso molecular - kDa (Pharmacia – LMW) (2). Coloração do gel pela prata.

4 – DISCUSSÃO

Os anticorpos monoclonais podem ser empregados para aumentar a especificidade do diagnóstico¹², ampliar os conhecimentos sobre a resposta imunológica e identificar inter-relação antigênica entre parasitos relacionados filogeneticamente, tais como *Ascaris* spp., *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina*⁵.

A avaliação individual dos componentes do antígeno TES possibilita determinar seu valor no imunodiagnóstico. Bandas de alto peso molecular, entre 132 a 200 kDa, apresentam reatividade cruzada em soros de pacientes infectados por outros helmintos⁷. Entretanto, os AcMos 1 e 2 reconheceram bandas entre 29 e 72 kDa do AgSoAs.

A similaridade da reatividade dos AcMos^{9,12}, independente do isotipo e do reconhecimento de determinantes de carboidrato ou de peptídeo, pode ser explicada, provavelmente, pelo fato de que diferentes epitopos existentes na mesma glicoproteína podem ser reconhecidos por AcMos distintos.

No presente trabalho, pôde-se observar reações cruzadas dos AcMos anti-*T. canis*, através de ELISA e *Western blotting*. Essas observações vêm ao encontro de diversos trabalhos que demonstraram a importância da reatividade cruzada de *T. canis* com *Ascaris* spp.^{4,6}, confirmando a inter-relação antigênica estreita entre essas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERNE, M.E.A. Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de *Fasciola hepatica* através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico. Belo Horizonte, 1994. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
2. BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
3. CAMARGO, E.D.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J.; SILVA, M.V.; CHIEFFI, P.P.; MELO, E.O. 1992. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocaríasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 34 (1): 55-60.
4. CUÉLLAR, C.; FENOUIY, S.; GUILLÉN, J.L. 1992. Cross-reactions of sera from *Toxocara canis*-infected mice with *Toxascaris leonina* and *Ascaris suum* antigens. *Int. J. Parasitol.*, 22(3): 301-307.
5. KENNEDY, M.W.; QURESHI, F.; FRASER, E.M.; HASWEL-ELKINS, M.R.; ELKINS,

- D.B.; SMITH, H.V. 1989. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. *Clin. Exp. Immunol.*, 75: 493-500.
6. LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.N.; TURNER, K.J. 1988. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol.*, 10: 323-337.
7. MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIÈRES, P.; CHARLET, J.P.; DE LARRARD, B. 1991. Application of the Western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.*, 77: 697-702.
8. MAIZELS, R.M.; DE SAVIGNY, D.; OGILVIE, B.M. 1984. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol.*, 6: 23-37.
9. MAIZELS, R.M.; KENNEDY, M.W.; MEGHJI, M.; ROBERTSON, B.D.; SMITH, H.V. 1987. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *The Journal of Immunology*, 139 (1): 207-214.
10. MEIGHJI, M.; MAIZELS, R.M. 1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 18: 155-170.
11. RUBINSKY-ELEFANT, G.; MELLO, E.O.; KANAMURA, H.Y.; GRAFF-TEIXEIRA, C. 2001. Aspectos soropidemiológicos da toxocaríase humana em Esteio, RS, Brasil. In: Congresso Latinoamericano de Parasitologia, 15, Jornal Brasileiro de Patologia., 37(4): 125.
12. SCAINI, C.J. Anticorpos monoclonais contra o antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* e cinética da produção de anticorpos em camundongos BALB/c infectados experimentalmente. Pelotas, 2001. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 2001.