

# IMUNIZAÇÃO INTRA-ESPLÊNICA DE CAMUNDONGO COM ANTÍGENO EXCRETOR-SECRETOR DE *TOXOCARA CANIS* IMOBILIZADO EM MEMBRANA DE NITROCELULOSE.

C.M. NUNES<sup>1</sup>, R.N. TUNDISI<sup>2</sup>, M.B. HEINEMANN<sup>3</sup>, J.F. GARCIA<sup>1</sup>, S. OGASSAWARA<sup>3</sup> & L.J. RICHTZENHAIN<sup>1</sup>.

(1) Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Curso de Medicina Veterinária-UNESP-campus Araçatuba, Rua Clóvis Pestana, 793, Jd. D. Amélia, Araçatuba, São Paulo, 16050-680; (2) Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; (3) Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- USP.

**SUMÁRIO:** A infecção humana por larvas de *Toxocara canis*, um dos nematóides intestinais do cão, leva a uma síndrome clínica caracterizada por febre, anorexia, hepatomegalia, tosse e eosinofilia conhecida por Larva Migrans Visceral (LMV). O diagnóstico da LMV é baseado em reações sorológicas já que não há eliminação de ovos e/ou larvas pelo hospedeiro humano. Desde o estudo feito por de SAVIGNY (1975) os antígenos mais recentemente utilizados para o diagnóstico da LMV são os produtos metabólicos, os quais são eliminados de larvas do 3º estágio de *T. canis* cultivadas *in vitro* sendo denominados antígenos excretor-secretor (TES). Ainda que as larvas possam ser cultivadas por até 18 meses, um dos fatores limitantes ao estudo de tais antígenos tem sido a baixa concentração protéica obtida. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter soro hiperimune específico a partir de frações do antígeno TES presentes em baixa concentração protéica e imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Vinte e sete camundongos foram imunizados com frações de extrato TES de mobilidade relativa próxima de 100 kDa. Após anestesia, 2 triângulos de aproximadamente 0,3 mm<sup>2</sup> de área contendo as frações foram inseridos abaixo da cápsula do baço, com auxílio de uma agulha. Os animais foram imunizados por 2 vezes consecutivas, com intervalo de 15 dias. À revelação imunoenzimática de membrana de nitrocelulose contendo o extrato TES total, observou-se o aparecimento de várias bandas de peso molecular mais baixo daquele para o qual os anticorpos foram gerados, evidenciando não só a eficiência da imunização bem como sugerindo que há repetição de epitopos neste extrato.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Toxocara canis*, antígeno excretor-secretor, imunização intra-esplênica, western blotting.

## INTRODUÇÃO

A infecção humana por larvas de *Toxocara canis*, um dos nematóides intestinais do cão, leva a uma síndrome clínica caracterizada por febre, anorexia, hepatomegalia, tosse e eosinofilia conhecida por Larva Migrans Visceral (LMV).

O diagnóstico da LMV é baseado em reações sorológicas já que não há eliminação de ovos e/ou larvas pelo hospedeiro humano. Os testes sorológicos variam em sensibilidade e especificidade devido a diferenças quanto a definição de título diagnóstico, modificações técnicas introduzidas nos laboratórios e principalmente quanto ao extrato antigênico utilizado (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981).

Desde o estudo feito por de SAVIGNY (1975) os antígenos mais utilizados são os produtos metabólicos, os quais são eliminados de larvas do 3º estágio de *T. canis* cultivadas *in vitro* sendo denominados antígenos excretor-secretor- TES (SCHANTZ, 1989).

Os antígenos TES constituem-se numa mistura complexa de glicoproteínas (SUGANE & OSHIMA, 1983; MAIZELS *et alii*, 1984; MEGHJI & MAIZELS, 1986) e não parecem ser gênero ou espécie-específicos pois amostras de soro de pacientes com diversas parasitoses particularmente ascariase, estrongiloidíase, hidatidose, esquistossomíase e filariase apresentam reação cruzada com aqueles antígenos (MAIZELS *et alii*, 1984; LYNCH *et alii*, 1988; SCHANTZ, 1989; MAGNAVAL *et alii*, 1991; CAMARGO *et alii*, 1992).

Além disto, certos determinantes antigênicos glicosilados são repetidos nas moléculas nativas de TES e não parecem ser produtos de um precursor ou devido a degradação (MAIZELS *et alii*, 1987).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais resultou em aumento da especificidade dos métodos sorológicos porém são de difícil produção e podem ser direcionados a epitopos sensíveis às condições de SDS-PAGE e transferência. Assim, anticorpos monoespecíficos policlonais podem ser mais interessantes para determinados estudos (KNUDSEN, 1985).

Embora as larvas de *T. canis* possam ser cultivadas por até 18 meses (de SAVIGNY, 1975) um dos fatores limitantes ao estudo de tais antígenos tem sido a baixa concentração protéica obtida. Cada larva produz, em média, 2ng de antígenos TES ao dia (MAGNAVAL *et alii*, 1994) dificultando sua ampla aplicação para o diagnóstico da LMV.

O fracionamento dos antígenos TES por cromatografia objetivando aumento da especificidade das provas diagnósticas, torna-se inviável devido a dificuldade em obtê-los em grande quantidade. A obtenção de soro hiperimune pode ser útil para o aprimoramento do diagnóstico da Larva Migrans Visceral.

A imunização de animais com antígenos presentes apenas em concentração de nanogramas requer considerações especiais quanto a via e forma de administração dos antígenos (NILSSON *et alii*, 1987).

A análise eletroforética dos antígenos TES em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) e por "western blotting" (WB) demonstrou a existência de 5 a 20 frações de Mobilidade relativa (Mr) entre 24 e 400 kDa (MAIZELS *et alii*, 1984; LYNCH *et alii*, 1988). Sete frações imunogênicas observadas no WB por MAGNAVAL *et alii* (1991) foram consideradas mais importantes para o diagnóstico da LMV sendo divididas em 2 grupos distintos: frações de alto peso molecular, compreendendo as frações de Mr de 200, 147 e 132 kDa e frações de baixo peso molecular com Mr de 35, 30, 28 e 24 kDa.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter soro hiperimune específico a partir de frações do extrato antigênico TES separados por SDS-PAGE, presentes em baixa concentração protéica e imobilizadas em membrana de nitrocelulose.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Produção de extrato antigênico excretor-secretor de *Toxocara canis* (TES):** Exemplos adultos de *T. canis* foram obtidos de cães de até 2 meses de idade, através do tratamento com adipato de piperazina (100mg/kg P.V.). Inicialmente as fêmeas adultas dos vermes foram lavadas em água corrente e em solução

fisiológica e os ovos obtidos através da dissecação do útero foram colocados em estufa (28°C), por 30 dias, em solução de formalina a 2%, para embrionamento. A obtenção do TES a partir das larvas mantidas em cultivo foi realizada segundo de SAVIGNY (1975). Resumidamente, os ovos embrionados foram tratados por 10 a 15 min com solução de hipoclorito de sódio 5% para a eliminação da capa protéica e a seguir rompidos por agitação forte com pérolas de vidro por 15-30 min, para liberação das larvas (L<sub>3</sub>) as quais foram concentradas em aparelho de Baermann modificado por 2 a 2,5 h, sendo a seguir colhidas e mantidas a 37°C em meio mínimo de Eagle contendo antibióticos. A cada 7 dias, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e estocado à -20°C. O meio assim obtido foi centrifugado a 2.000 g/10 min e o sobrenadante foi concentrado em aparelho concentrador (AMICON -membrana YM10). O concentrado foi dialisado em água bidestilada por 24 a 30 h/4°C vindo então a constituir o extrato antigênico TES o qual foi conservado em alíquotas a -70°C.

**Produção de extrato antigênico da forma adulta de *Ascaris suum* (AS):** Exemplos adultos de *A. suum* foram obtidos em frigorífico (FISA) sendo processados segundo CAMARGO *et alii* (1992). Resumidamente, os parasitas foram cortados com tesoura e bisturi, macerados em gral e posteriormente passados em homogeneizadores de tecidos tipo "Mixer" e tipo "Potter". O extrato obtido foi transferido para tubos de centrifugação sendo adicionada solução de NaOH 1M e promovida a agitação manual. A seguir o extrato foi neutralizado com HCl 1N e centrifugado a 1.500g/1h/4°C. O sobrenadante foi colhido e filtrado em seringas com membrana de 22 mm (Millipore). Ao filtrado foi adicionado 1/3 do volume total de éter sulfúrico, com agitação periódica por 16 h/4°C, para retirada de lipídeos. A seguir o extrato foi centrifugado a 30.000 g/30 min/4°C, desprezando-se a camada superficial de lipídeos. O sobrenadante, que constituiu-se no extrato AS, foi colhido e conservado em alíquotas a -70°C.

**Avaliação da reatividade imunogênica através do Western blotting (WB):** As proteínas contidas no extrato TES foram fracionadas através da técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973) em gradiente de 5 a 15%, em tampão Tris/HCl 0,375M, pH 8,8, partindo-se de 1 mg de extrato TES. A transferência para membrana de nitrocelulose (TOWBIN *et alii*, 1979) foi realizada em célula de transferência "Semi-dry electrophoretic cell" (Bio-rad), em tampão Tris/Glicina 25 mM, pH 8,3.

Para análise imunoenzimática, as membranas foram bloqueadas por 2 h com tampão PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado e incubadas por 1,5 h com o soro a ser testado. Após a incubação por 1h com o conjugado (anti-IgG humana e anti IgG de camundongo marcada com peroxidase, na diluição 1/3.000), a reação foi revelada com uma solução cromógena constituída de PBS contendo 0,15% de peróxido de hidrogênio e 0,0165% de diaminobenzidina. Após a adição dos soros e do

conjugado, as tiras foram lavadas 4 vezes por 10 minutos cada uma com tampão PBS acrescido de 5% de leite em pó desnatado.

A reatividade imunogênica das diferentes frações do extrato TES foi avaliada com uma amostra de soro humano de paciente com suspeita clínica e diagnóstico sorológico positivo para LMV. Utilizou-se também uma amostra do anticorpo monoclonal Tcn26 (BOWMAN *et alii* 1987) diluído 1/100. Neste caso utilizou-se o conjugado constituído de anti-IgM de camundongo marcado com peroxidase na diluição 1/1.000.

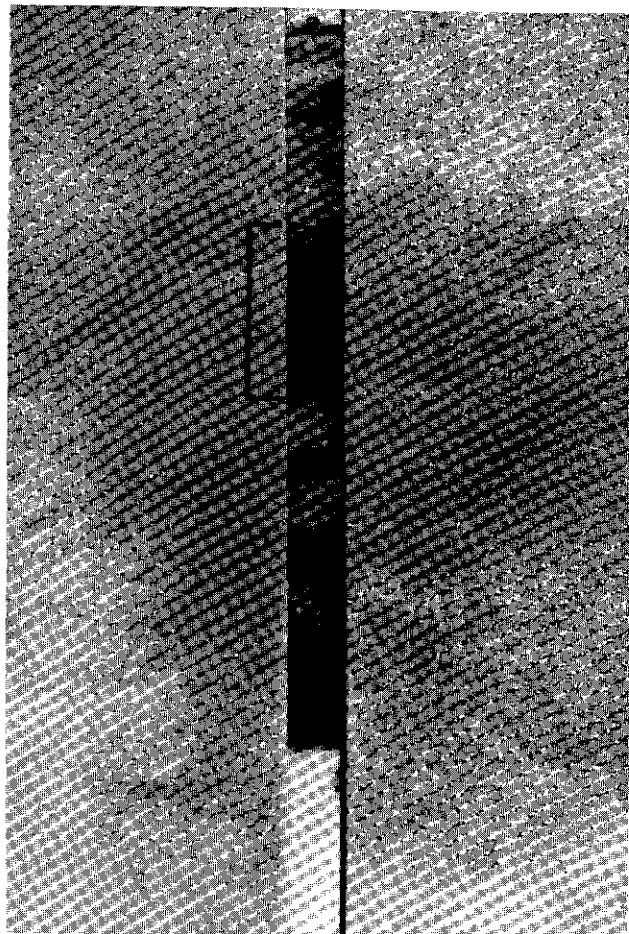
**Imunização Intra-esplênica:** Para a sensibilização intra-esplênica realizada segundo NILSSON *et alii* (1987), foram utilizados 27 camundongos CH3 Rockfeller machos, com peso médio entre 45 e 50 g, os quais tiveram amostras de suas fezes submetidas ao exame coproparasitológico no início e no final do experimento, não se constatando presença de ovos, larvas ou oocistos de parasitas. Os animais foram imunizados por duas vezes consecutivas, com intervalo de 15 dias, com 2 triângulos de aproximadamente 0,3 mm<sup>2</sup> de área contendo a fração de  $\approx 100$  kDa do extrato antigênico TES, inseridos abaixo da cápsula do baço, com auxílio de uma agulha. Para tal, os animais foram anestesiados com cloridrato de xilasina a 0,1% e quetamina a 0,4%, I.M.; a abordagem cirúrgica foi feita pela região paralombar. Como grupo controle 3 animais foram imunizados com membrana de nitrocelulose submetida às mesmas condições de transferência porém, sem o extrato TES. A colheita de sangue foi feita 15 dias após a sensibilização, por meio do plexo braquial direito, com os animais sedados com éter etílico. A evidenciação da eficiência da imunização foi realizada através da técnica do WB com "pool" do soro dos camundongos diluído 1/80.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume médio de soro total obtido dos camundongos imunizados foi de 400  $\mu$ l. Comparando-se à produção de anticorpos monoclonais, por resultar em volume relativamente grande e tratar-se de método mais fácil de produção de soro monoespecífico, a imunização intra-esplênica pode ser alternativa mais prática àquele método.

A Figura 1 apresenta a análise imunoenzimática do soro de um paciente com suspeita clínica de LMV. Observa-se o reconhecimento de várias bandas conforme descrições anteriores (MAIZELS *et alii*, 1984; LYNCH *et alii*, 1988; MAGNAVAL *et alii*, 1994). Estudos realizados por alguns autores sugerem que as frações protéicas de Mr alta (120, 132, 147 e 200 kDa) e de Mr baixa (24,28,32 e 35 kDa) devam estar dentre as mais específicas de *T. canis* (MAIZELS *et alii*, 1984; MAGNAVAL *et alii*, 1991;1994). Por este motivo, para a

Figura 1 - Western blotting de extrato ES (1 mg) de *Toxocara canis*. (a) soro de paciente com suspeita clínica e diagnóstico positivo para Larva Migrans Visceral diluído 1/320. A chave indica as frações de mobilidade relativa próxima de 100kDa utilizadas na imunização de camundongos.

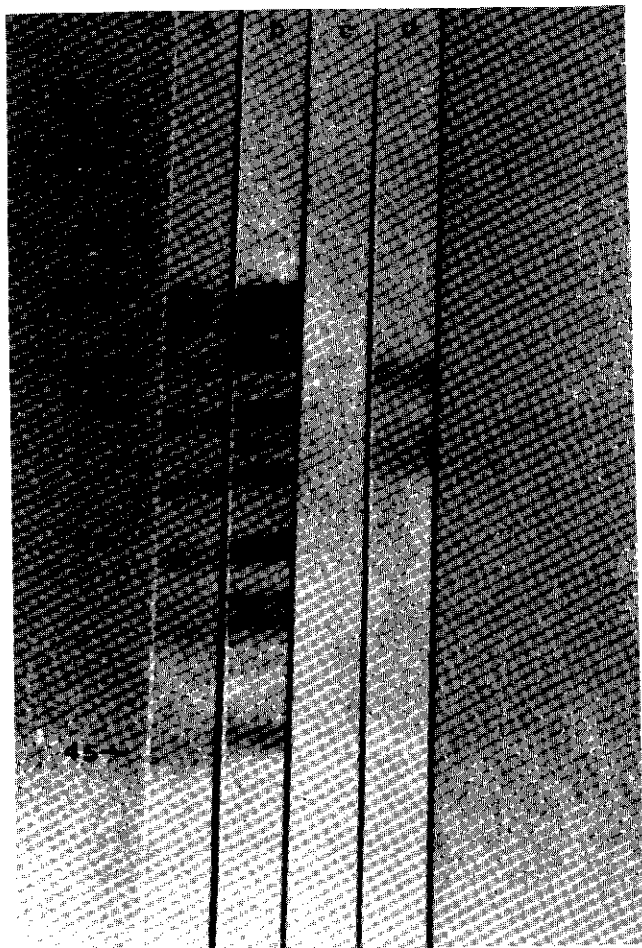


obtenção de soro hiperimune específico, as frações de Mr próxima de 100 kDa imobilizadas em membrana de nitrocelulose foram utilizadas para sensibilização de camundongos.

A Figura 2a apresenta a análise imunoenzimática do soro dos animais sensibilizados com a fração de peso molecular próxima de 100 kDa ( $\approx 100$  kDa), frente ao extrato TES. Além de revelar a eficiência da imunização, observa-se também o reconhecimento de várias bandas de Mr menor que 100 kDa, sugerindo que possa ocorrer repetição de epitopos no extrato TES, anteriormente evidenciada com anticorpos monoclonais por MAIZELS *et alii* (1987). Quando se procedeu a absorção do soro hiperimune com extrato de *Ascaris suum* adulto (diluição 1/50), não houve alteração do padrão de bandas sugerindo que o anti-soro obtido não apresenta reações cruzadas com *A. suum* (Figura 2b). Na Figura 2c observa-se ausência de reconhecimento de bandas pelo soro dos animais do grupo controle. Utilizando-se anticorpo monoclonal (Tcn26) cedido pelos Drs. Grieve e Bowman da Escola de Medicina

Veterinária-Universidade de Wisconsin- USA) observou-se o reconhecimento de duas bandas conforme citação dos autores (BOWMAN *et alii* 1987), reforçando a evidência de repetição de epitopos no extrato TES (Figura 2d), conforme estudos anteriores.

Figura 2 - Western blotting de extrato ES (1 mg) de *Toxocara canis*. (a) pool de soro de camundongos 1/80, pós-imunização com fração  $\geq 100$  kDa de extrato ES; (b) soro anterior absorvido com extrato AS 1/50; (c) pool de soro de camundongos negativos 1/80; (d) anticorpo monoclonal Tcn26 1/100.



Os resultados apresentados indicam que é possível a imunização intraesplênica de camundongos a partir de frações antigênicas de *T. canis* presentes em baixa concentração protéica e imobilizadas em membrana de nitrocelulose. Este procedimento simplifica o processo de purificação do antígeno, quando objetiva-se a obtenção de soro hiperimune. Além disto, a utilização destes anticorpos mono-específicos em técnicas como o ELISA "sandwich" contribuirá para o aumento da especificidade do diagnóstico da Larva Migrans Visceral, podendo ser alternativa prática e barata ao emprego de anticorpos monoclonais.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Bowman e Dra. Grieve (Escola de Medicina Veterinária-Universidade de Wisconsin-USA) pela gentileza de enviar uma alíquota do anticorpo monoclonal Tcn26. À Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pela cessão de amostra de soro de paciente com suspeita clínica de LMV.

## SUMMARY

Visceral larva migrans (VLM) is a clinical syndrome caused by infection of man by *Toxocara canis*, the common roundworm of dogs. Neither worms nor eggs are eliminated in human feces and because larvae are difficult to detect in tissues, diagnosis is mostly based on serology. Antigens used for the immunodiagnostic tests are referred to as *Toxocara* excretory-secretory (TES) antigens. Although larvae can be cultivated for 18 months TES protein concentrations yielded is low. This investigation aimed at immunizing mice by intrasplenic deposition of low quantities of TES protein attached to nitrocellulose paper strips. Twenty seven mice were immunized with fractions of molecular weight of 100 kDa. The effectiveness of immunization was investigated by western blotting analysis and several bands of molecular weight lower than 100 kDa were seen.

**KEY WORDS:** *Toxocara canis*, excretor-secretor antigen, intraesplenic immunization.

## REFERÊNCIAS

- BOWMAN, D.D.; MIKA-GRIEVE, M. & GRIEVE, R.B. (1987). *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to larval excretory-secretory antigens that bind with genus and species specificity to the cuticular surface of infective larvae. *Experimental Parasitology*, 64:458-65.
- 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 toxocariasis and comparison of the essay with ELISA. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34:55-60.
- GLICKMAN, L.T. & SCHANTZ, P.M. (1981). Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiological Review*, 3:230-50.
- KNUDSEN, K.A. Proteins transferred to nitrocellulose for use as immunogens. (1985). *Analytical Biochemistry*, 147:285-8.

- LAEMMLI, V.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*,227:680-5.
- LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.N. & TURNER, K.J. (1988). Specificity of Toxocara ELISA in tropical population. *Parasite Immunology*, 10:323-37.
- MAIZELS, R.M.; de SAVIGNY, D.H. & OGILVIE, B.M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology*,6:23-37.
- 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*. *Journal of Immunology*,139:207-14.
- MAGNAVAL, J.F.; FABRE, R.; MAURIÈRES, P.; CHARLET, J.P. & de LARRAD, B. (1991). Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research*,77:697-702.
- MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T. & DORCHIES, P. (1994). La toxocarose, une zoonose helminthique majeure. *Revue de Médecine Veterinaire*, 145:611-27.
- MEGHJI, M. & MAIZELS, R.M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18:155-70.
- NILSSON, B.O., SVALANDER, P.C. & LARSSON, A. (1987). Immunization of mice and rabbits by intrasplenic deposition of nanograms quantities of protein attached to Sepharose beads or nitrocellulose paper strips. *Journal of Immunological Methods*,99:67-75.
- de SAVIGNY, D.H. (1975). *In vitro* maintenance of *Toxocara* larvae and simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*,61:781-2.
- SCHANTZ, P.M. (1989). *Toxocara* larva migrans now. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,41:21-34.
- STUDIER, S.W. (1973). Analysis of bacteriophage T<sub>7</sub> early RNA and proteins on slab gels. *Journal of Molecular Biology*,79:237-48.
- SUGANE, K. & OSHIMA, T. (1983). Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology*, 50:113-20.
- TOWBIN, H. & STAEGELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,76:4350-54.

(Received 15 April 1997, Accepted 23 July 1997)