

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Imunodiagnóstico da toxocaríase humana com antígeno TES30
recombinante**

Paula de Lima Telmo

Pelotas, 2013

PAULA DE LIMA TELMO

**IMUNODIAGNÓSTICO DA TOXOCARÍASE HUMANA COM ANTÍGENO TES30
RECOMBINANTE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: biologia molecular/imunologia/parasitologia).

Orientador: Fabricio Rochedo Conceição

Co-Orientador: Carlos James Scaini

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:

Ubirajara Buddin Cruz ñ CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T277i Telmo, Paula de Lima
Imunodiagnóstico da toxocaríase humana com
antígeno TES30 recombinante / Paula de Lima Telmo. ñ
104f. : il. ñ Tese (Doutorado). Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de
Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico.
Pelotas, 2013. ñ Orientador Fabrício Rochedo Conceição ;
co-orientador Carlos James Scaini.

1.Biotecnologia. 2.Diagnóstico. 3.T. canis. 4.Proteína
recombinante, 5.TES30. 6.Escherichia coli. 7.Pichia
pastoris. I.Conceição, Fabrício Rochedo. II.Scaini, Carlos
James. III.Título.

CDD: 576.163

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Orientador), Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Carlos James Scaini (Coorientador), Universidade Federal de Rio Grande

Profa. Dra. Maria Elisabeth Aires Berne, Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Neuza Maria Alcântara-Neves, Universidade Federal da Bahia

Dedicatória

Aos meus pais, Sidnei e Leni, meus primeiros professores, meus mestres e doutores, minha pedra basilar, meu porto seguro, apoio incondicional que me sustenta física, emocional e espiritualmente, ensinando que se eu quero tornar o mundo melhor, preciso começar a mudança por mim mesma.

Se você entrar no mundo sabendo que é amado, e deixar esse mundo sabendo o mesmo, então, tudo que acontecer no meio pode ser enfrentado

(Michael Jackson)

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas por me proporcionar a realização do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao meu orientador Fabricio, pela orientação e experiência dividida, pelo crédito, pelo apoio, pela paciência e pelo incentivo nos momentos de angústia, durante o desenvolvimento de todo o trabalho.

Ao meu co-orientador, meu querido chefe Scaini, por estar presente em mais uma etapa do meu crescimento profissional e pessoal, sempre acreditando no meu potencial, me incentivando, estimulando e colaborando com sinceridade, amizade e carinho.

Ao Prof. Fábio Leivas Leite pelo auxílio constante no desenvolvimento do trabalho e por permitir que o mesmo se desenvolvesse em seu laboratório, bem como pelo carinho, pelo incentivo, pelo apoio e pelos momentos de descontração ao longo destes quatro anos.

À professora Neuza Alcântara-Neves, meus sinceros e profundos agradecimentos, pela acolhida, pelo carinho, pela disponibilidade, pela orientação nos momentos de desorientação, pelo apoio e valiosos ensinamentos.

Aos demais professores que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, pelos anos de boa convivência, coleguismo e em especial à Michele Pepe Cerqueira e à Paula Finger, por dividirem comigo as atividades experimentais relacionadas à expressão da *Pichia pastoris*.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada pelos momentos de descontração e bom convívio.

Aos colegas dos Laboratórios de Parasitologia, tanto da UFPel, quanto da FURG, pelos momentos de alegria, de chimarrão e de comilanças, troca de idéias, apoio, incentivo e amizade.

Aos estagiários, partes essenciais ao desenvolvimento dos trabalhos de pós-graduação, especialmente ao Carlos Eduardo Pouey da Cunha, que esteve comigo desde o início, me auxiliando, buscando juntamente as soluções dos problemas ao longo do percurso, no entendimento dos desmangos por entre dentes, me apoiando nos momentos difíceis, me fazendo rir nos momentos de descontração, enfim, pelo profissionalismo, pelo coleguismo e pela amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Alergia e Acarologia (LAA) da Universidade Federal da Bahia, minha maior e bela surpresa, especialmente ao G1 ã Anita, Léo e Marcinha. Obrigada pelos corações amorosos, cuidadosos, alegres, sinceros e envolventes... muito obrigada pela recepção calorosa, companheirismo, trabalho árduo e prazeroso, profissionalismo, otimismo, amizade... por me fazerem sentir parte do grupo desde o primeiro dia...

Aos meus amigos, irmãos-camaradas, de cara lavada e de alma exposta, família que Deus me permitiu escolher... agradeço por estarem comigo ao longo de muitos anos, nos bons e nos maus momentos, me incentivando, dando apoio e suporte emocional, partilhando comigo o riso fácil, o abraço apertado, as alegrias, as tristezas,

as angústias e as perdas... por exigirem minha presença, mas aceitarem a minha ausência. Muito obrigada...

Aos meus pais e familiares, peças essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, pelo inesgotável e constante apoio e incentivo.

A Deus, causa primária de todas as coisas. Sopro de vida e divina inspiração.

*ÓAgradeço a todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.*

As facilidades nos impedem de caminhar.

Mesmo as críticas nos auxiliam muito.ô

(Francisco Cândido Xavier)

Epígrafe

*✠E ainda que tivesse o dom da profecia,
e conhecesse todos os mistérios da ciência (...),
se não tivesse Caridade eu nada seria✠*
Paulo de Tarso

Resumo

TELMO, Paula de Lima. Universidade Federal de Pelotas. **Imunodiagnóstico da toxocaríase humana com antígeno TES30 recombinante**. 2013. 104f. Tese (Doutorado) ã Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A toxocaríase humana é uma zoonose difundida em todo o mundo, constituindo-se em um importante problema de saúde coletiva, porém é negligenciada. A diversidade de quadros clínicos associada aos diferentes sítios (fígado, pulmões, cérebro, olhos, gânglios linfáticos, etc.) em que as larvas de *Toxocara canis* podem se alojar no organismo humano, dificulta o diagnóstico desta parasitose. Neste contexto, métodos imunológicos para a detecção de anticorpos anti-*T. canis* foram desenvolvidos. Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) associado ao antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES), com adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* spp., tem sido utilizado como método padrão para pesquisa de anticorpos IgG séricos anti-*T. canis*. O antígeno TES é obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis* e demanda, aproximadamente, quatro meses de trabalho dispendioso e fastidioso. Diante do exposto, antígenos recombinantes estão sendo testados, visando o aperfeiçoamento do imunodiagnóstico da toxocaríase humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir o antígeno de excreção/secreção de 30kDa de *T. canis* (TES30) em dois sistemas heterólogos de expressão protéica, e avaliá-los no imunodiagnóstico da toxocaríase humana. As proteínas recombinantes rTES30E e rTES30P produzidas em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, respectivamente, foram caracterizadas através de ELISA-IgG com soros de camundongos infectados experimentalmente, demonstrando 100% de eficácia em comparação ao TES nativo. Na análise dos soros humanos, com ELISA-IgG a rTES30E apresentou sensibilidade e especificidade (IC 95%) de 95,8% e 82,6%, enquanto a rTES30P apresentou 95,4% e 92,8%, respectivamente, em comparação ao TES nativo. Assim, conclui-se que ambas as proteínas recombinantes apresentam potencial antigênico, constituindo-se em uma alternativa ao uso do TES nativo no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.

Palavras-chave: Diagnóstico. *T. canis*. Proteína recombinante TES30. *Escherichia coli*. *Pichia pastoris*.

Abstract

TELMO, Paula de Lima. Universidade Federal de Pelotas. **Imunodiagnóstico da toxocaríase humana com antígeno TES30 recombinante**. 2013. 104f. Tese (Doutorado) ã Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The toxocariasis is a widespread zoonosis worldwide, thus becoming an important public health problem. The diversity of clinical conditions associated with the different sites (liver, lungs, brain, eyes, lymph nodes, etc.) of the *Toxocara canis* larvae in the human body, hamper the diagnosis of this disease. In this context, immunological methods for detecting anti-*T. canis* serum antibodies were developed. Currently, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) associated with the excretory-secretory antigens of *T. canis* larvae (TES), and sera previously adsorbed with somatic antigen of *Ascaris* spp. has been used as a standard method for testing of IgG anti-*T. canis* serum antibodies. The antigen TES is obtained from *T. canis* larvae cultivation and demand four months of expensive and laborious work. Given the above, recombinant antigens are being tested, aiming at improving the immunodiagnosis of human toxocariasis. The objective of this work was to produce recombinant excretion/secretion 30kDa *T. canis* larval antigen (TES30) in two heterologous protein expression systems, and evaluate them in the immunodiagnosis of human toxocariasis. The recombinants proteins rTES30E and rTES30P, respectively, produced in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, were characterized by un indirect ELISA to detect anti-*T. canis* IgG in experimentally infected mice serum, which showed 100% effectiveness compared to native TES. For detecting anti-*T. canis* IgG antibodies in human sera, the rTES30E showed sensitivity and specificity (95% CI) of 95.8% and 82.6%, while rTES30P showed 95.4% and 92.8%, respectively, in comparison to native TES. Thus, we conclude that both recombinants proteins have antigenic potential, becoming an alternative to the use of native TES in immunodiagnosis of human toxocariasis.

Keywords: Diagnosis. *T. canis*. Recombinant protein. TES30. *Escherichia coli*. *Pichia pastoris*.

Lista de Figuras

Artigo 2	Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de <i>Toxocara canis</i> produzida em <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 1	Gel de agarose 1% demonstrando a construção do vetor pAE/tes30 digerido com enzimas de restrição, mostrando a liberação do inserto de 645pb.....	50
Figura 2	Expressão da proteína recombinante rTES30E em <i>E. coli</i> em SDS-PAGE 12%.....	50
Figura 3	Western blot demonstrando a confirmação da expressão da proteína rTES30E frente ao MAb anti-6xHis, revelado com Quimioluminescência e com DAB.....	51
Figura 4	Diagrama de Características de Operação do Receptor para comparar o antígeno recombinante rTES30E e o antígeno nativo TES frente a soro de camundongos infectados experimentalmente.....	51
Artigo 3	Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de <i>Toxocara canis</i> produzida em <i>Pichia pastoris</i>	52
Figura 1	Gel de agarose 0,8% demonstrando a caracterização enzimática dos recombinantes.....	67
Figura 2	Colony blot demonstrando a expressão da proteína rTES30P..	67
Figura 3	Western blot demonstrando a confirmação da expressão da proteína rTES30P frente a soro de camundongo positivo para <i>Toxocara canis</i> (1:50) e frente ao MAb anti-6xHis, revelado com Quimioluminescência.....	68
Figura 4	Análise de Características de Operação do Receptor para avaliar o antígeno recombinante rTES30P, frente a soro de camundongos experimentalmente infectados com <i>T. canis</i> , em comparação ao antígeno nativo TES.....	68
Artigo 4	Avaliação do antígeno TES30 de <i>Toxocara canis</i> produzido em <i>Escherichia coli</i> e <i>Pichia pastoris</i> no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.....	69
Figura 1	Diagrama de Características de Operação do Receptor mostrando a acurácia do antígeno recombinante rTES30E no teste diagnóstico com soros humanos (n=307) quando comparado com o antígeno nativo TES.....	87
Figura 2	Diagrama de Características de Operação do Receptor mostrando a acurácia do antígeno recombinante rTES30P no teste diagnóstico com soros humanos (n=307) quando comparados com o antígeno nativo TES.....	87
Figura 3	Curva de Características de Operação do Receptor (ROC) da comparação entre os dois antígenos recombinante rTES30E e rTES30P no teste diagnóstico para toxocaríase humana em relação ao antígeno nativo TES.....	88

Sumário

1 Introdução geral.....	13
2 Artigo	
2. 1 Artigo 1: Biotechnological approaches for the control of human toxocariasisë ...	16
Introductionë ë	17
Immunodiagnosis with recombinant antigensë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë .	19
Development of new therapiesë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ë ..	20
Preventionë .	22
Referencesë ë	24
2. 2 Artigo 2: Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de <i>Toxocara canis</i> produzida em <i>Escherichia coli</i>	32
Introdução.....	35
Material e Métodos.....	36
Resultados.....	40
Discussão.....	41
Referências bibliográficas.....	44
2. 3 Artigo 3: Expressão do antígeno TES-30 de <i>Toxocara canis</i> em <i>Pichia pastoris</i>	52
Introdução.....	55
Material e Métodos.....	56
Resultados.....	60
Discussão.....	61
Referências bibliográficas.....	63
2. 4 Artigo 4: Avaliação do antígeno recombinante TES30 de <i>Toxocara canis</i> produzido em <i>Escherichia coli</i> e em <i>Pichia pastoris</i> frente à toxocaríase humana.....	69
Introdução.....	72
Material e Métodos.....	73
Resultados.....	75

Discussão.....	75
Referências bibliográficas.....	81
3 Conclusões.....	89
Referências.....	90

Introdução Geral

A síndrome da larva *migrans* visceral (LMV) foi definida como o resultado da migração e persistência de larvas de helmintos nos tecidos de hospedeiros acidentais (BEAVER, 1969). A toxocaríase humana tem como agente etiológico mais associado o nematóide *Toxocara canis*, parasito intestinal de cães.

A toxocaríase é uma zoonose cosmopolita (HOFFMEISTER et al., 2007), constituindo um importante problema de saúde coletiva (HARALAMBIDOU et al., 2005), porém, é negligenciada, resultando em taxas de prevalências subestimadas (TORGERSON; BUDKE, 2006). O relato da prevalência da toxocaríase em uma determinada região está diretamente relacionado à atenção dos profissionais que atuam na área da saúde para realizar o diagnóstico desta parasitose (SMITH et al., 2009). A prevalência desta infecção varia de acordo com a faixa etária, condições climáticas (GLICKMAN et al., 1979), nível sócio-econômico (MATOS et al., 1997), entre outros fatores.

A infecção por *T. canis* em seres humanos ocorre, principalmente, pela ingestão acidental de ovos embrionados do parasito, acometendo especialmente crianças de até cinco anos, devido ao maior contato com o solo contaminado (GLICKMAN et al., 1979), pela geofagia (SCHANTZ et al., 1980) e unicofagia (ALDERETE et al., 2003).

A diversidade de quadros clínicos associada aos diferentes sítios (fígado, pulmões, cérebro, olhos, gânglios linfáticos, etc.) em que as larvas de *T. canis* podem se alojar no organismo humano dificultam o diagnóstico desta parasitose. Na espécie humana não ocorre o desenvolvimento das larvas nos tecidos e a consequente formação do parasito adulto no intestino. Diante da dificuldade em detectar as larvas de *T. canis* no organismo humano, métodos imunológicos foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos específicos. Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA), associado ao antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES), com adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* sp., tem sido utilizado como método padrão na pesquisa de IgG anti-*T. canis*.

O antígeno TES, obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis*, apresenta as proteínas de massa molecular 26, 32, 45, 55, 70, 120 e 400kDa (MAIZELS et al., 1984). Estas proteínas são glicosiladas e antigênicas (MEGHJI; MAIZELS et al., 1986). Na fase aguda da toxocaríase, o antígeno TES é depositado pelas larvas de *T. canis* durante a migração nos tecidos e, na fase crônica, o antígeno é encontrado no granuloma em torno da larva ou na camada mais interna do granuloma sem a presença do parasito (PARSONS et al., 1986).

A detecção de anticorpos específicos é extremamente relevante para confirmar o diagnóstico clínico e para realizar o tratamento das diferentes formas clínicas da toxocaríase humana. Entretanto, existem controvérsias em relação à sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos devido à carência de métodos eficazes para a detecção do parasito e pela dificuldade em determinar um ponto de corte (*cut off*) fidedigno na sorologia. Estudos visando avaliar a eficácia do ELISA-TES (título > 1:32) em grupos de pacientes com toxocaríase sistêmica demonstraram, usando a sintomatologia compatível, como teste padrão ouro, demonstraram sensibilidade e especificidade de 78% e 90%, respectivamente (SMITH, 1993; CDC, 2011).

Antígenos recombinantes estão sendo testados, visando o aperfeiçoamento do imunodiagnóstico da toxocaríase. Estudos indicam que as frações de menor massa molecular do antígeno TES apresentam maior especificidade (MAGNAVAL et al, 1991) e que a proteína recombinante correspondente a 30kDa apresenta alta sensibilidade e especificidade (YAMASAKI et al, 1998; 2000).

Em vista dos resultados obtidos até o momento, indicando que o antígeno de massa molecular de 30kDa é promissor, foi delineado este trabalho visando produzir o antígeno TES30 de *T. canis* em dois sistemas de expressão heteróloga de proteínas, um procarioto, baseado na bactéria *Escherichia coli*, e outro eucarioto, baseado na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, para comparar as proteínas produzidas quanto ao rendimento, produtividade e antigenicidade.

Os dados gerados nesta tese estão apresentados na forma de artigos científicos. Esta forma de apresentação visa propiciar uma divulgação objetiva e rápida dos resultados obtidos. Desta forma, o artigo 1 trata de uma revisão sobre o diagnóstico, tratamento e prevenção da toxocaríase humana, onde se abordou

o papel da biotecnologia no diagnóstico, tratamento e controle da infecção. Este trabalho está formatado segundo as normas do periódico *Parasitology Research* (fator de impacto = 2.149), ao qual será submetido. Em seguida, o artigo 2 descreve a expressão, clonagem e a caracterização da proteína TES30 produzida em *E. coli*. A avaliação da proteína foi feita frente a soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. canis*. Este trabalho está formatado segundo as normas da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (fator de impacto = 1). O terceiro artigo descreve a expressão, clonagem e a caracterização da proteína TES30 produzida em *P. pastoris*. A avaliação da proteína foi feita frente a soros de camundongos infectados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis*. Este trabalho está formatado segundo as normas do periódico *Parasitology* (fator de impacto = 2.961). As proteínas recombinantes também foram comparadas quanto ao potencial diagnóstico frente a soros humanos pertencentes à soroteca do Laboratório de Alergia e Acarologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Este trabalho originou o artigo 4, que está formatado segundo as normas do periódico *International Journal for Parasitology* (fator de impacto = 3.393).

2.1 Artigo 1

Biotechnological approaches for the control of human toxocariasis

Paula de Lima Telmo, Carlos James Scaini, Marcelo Mendonça, Fabricio Rochedo
Conceição

Artigo segundo as regras da Revista Parasitology Research ao qual será
submetido.

Biotechnological approaches for the control of toxocariasis

Paula de Lima Telmo¹, Carlos James Scaini², Marcelo Mendonça¹, Fabricio Rochedo

Conceição^{1*}

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

²Faculdade de Medicina/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande, General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

*Corresponding author: Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil Tel.: 55 53 32757583; fax: 55 53 32757350. E-mail: fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

Abstract

Toxocariasis is a zoonotic disease caused by nematodes *Toxocara canis* and *Toxocara cati*, neglected by health authorities. In view of the difficulty of performing diagnosis and treatment, biotechnological approaches have been sought as an alternative for controlling this disease. In this mini-review some biotechnological advances related to control of human toxocariasis, such as immunodiagnostic with recombinant antigens, phytochemical therapy, as well as prevention through genetic immunomodulation and use of probiotics were discussed.

Keywords: *Toxocara canis*, toxocariasis, immunodiagnosis, phytochemical therapy, genetic immunomodulation, probiotics.

Introduction

Human toxocariasis is a chronic tissular parasitosis with cosmopolitan distribution that is common in developing countries with tropical climate. The prevalence of this zoonotic disease and its impact on public health are underestimated (Torgerson and Budke, 2006), even in developed countries (Hotez and Wilkins, 2009). In Brazil, epidemiological studies have revealed high exposure of children to this disease, with a prevalence ranging

from 28.8 to 54.8% (Alderete *et al.*, 2003; Despommier, 2003; Paludo *et al.*, 2007; Schoenardie *et al.*, 2012). However, in most cases, it is still considered an underdiagnosed disease in health services (Paludo *et al.*, 2007).

The majority of cases of human toxocariasis have been associated with parasitism caused by the nematode *Toxocara canis*, intestinal parasite of dogs. However, the importance of *Toxocara cati*, intestinal parasite of cats, as etiologic agent of this parasitic disease seems to be underestimated, thus there is a need of more studies of this parasitosis to demonstrate the importance of this specie (Fischer, 2003; Smith *et al.*, 2009).

In humans, the infective larvae spread by the systemic route and are encapsulated in different organs such as liver, lungs, brain, eyes, lymph nodes, among others, which can survive for up one year, causing symptomatic signals that differ according to the affected tissue (Despommier, 2003; Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010). The reactivation of the encapsulated larvae in an asymptomatic carrier may occur, leading to a migration of the larva to the eyes and/or brain. In this context, the clinical and serological monitoring of the patient is strategic for assessing the need of treatment (Pawlowski, 2001).

The main way of human infection is by ingestion of embryonated eggs present in dirty hands taken to the mouth. It can also occur by ingesting eggs adhered to fomites, foods (Despommier, 2003) and dog hairs (Amaral *et al.*, 2010). In the last decades, it has also been reported cases associated with consumption of viscera, raw or undercooked meats from paratenic hosts, such as chickens (Morimatsu *et al.*, 2006) and cattle (Choi *et al.*, 2008). Also, the vertical transmission in experimentally infected mice had been reported (Reiterová *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2008). The first record of congenital infection by *T. canis* occurred in a premature human neonate with retinopathy (Maffrand *et al.*, 2006). Thus, the diagnosis of toxocariasis in prenatal testing of pregnant women and the first months of life of children is highly required.

Information on other aspects of toxocariasis, such as genetic diversity of *T. canis*, epidemiology, clinical presentations, treatment, among others, can be found in recent literature reviews (Roldán *et al.*, 2010; Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010; Carvalho and Rocha, 2011; Pinelli and Aranzamendi, 2012; Chen *et al.*, 2012; Othman, 2012). Given the difficulty in making a diagnosis and treatment, biotechnological approaches have been gaining attention in the control of human toxocariasis. In this mini-review some biotechnological advances related to the control of human toxocariasis are discussed.

Immunodiagnosis with recombinant antigens

The diversity of clinical conditions associated with different sites where the larvae can lodge, makes it very difficult to diagnose toxocariasis. Moreover, in humans the development of larvae in the tissues and consequently formation of adult parasites in the gut does not occur. Hence, the detection of fecal egg is useless, although the presence of other parasites such as *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* indicates fecal exposure, increasing the likelihood of presence of *Toxocara* spp. larvae in the tissues (CDC, 2011).

The definitive diagnosis can only be performed by biopsy, but in general this procedure is not indicated because it is extremely invasive and there are still difficulties in detecting the larvae. Given this difficulty, different immunological methods have been developed, however, up to now there is no gold-standard method for laboratorial diagnosis of toxocariasis (Perez and Abe-Jacob, 1996). Currently, ELISA method with excretory-secretory antigen of *T. canis* (TES) (De Savigny, 1975) has been used as a standard method for diagnosis (Despommier, 2003). In this assay, the detection of specific IgG₂ and IgG₄ increases its sensitivity and specificity (Soares *et al.*, 1991; Noordin *et al.*, 2005). Nevertheless, the production of TES antigen is laborious, time consuming and with limited capacity (Mohamad *et al.*, 2009), and it requires trained technicians (Peixoto *et al.*, 2011) and the availability of adult female *T. canis* worms. In addition, the usually observed cross reactivity of this antigen with antibodies generated by other helminth infections (Magnaev *et al.*, 1991; Yamasaki *et al.*, 2000) requires preincubation of sera with antigens derived from related helminthes, which is another drawback of this method (Rubinsky-Elefant *et al.*, 2010). In this context, recombinant antigens from TES antigen fractions have been produced and tested (Yamasaki *et al.*, 2000, Coelho *et al.*, 2006; Wickramasinghe *et al.*, 2008; Mohamad *et al.*, 2009), aiming to find a method with better specificity, sensitivity and applicable for routine monitoring of toxocariasis.

The recombinant protein TES-120 (rTES-120) produced in *Pichia pastoris* was evaluated in Western blot (WB), a laborious and costly test, showing high specificity when confronted with sera from patients with other different parasitic infections (Fong and Lau 2004). Interestingly, rTES-120 was produced in the cytoplasm using the yeast vector pPICZA, suggesting that the lack of glycosylation of the recombinant antigen did not affect the test performance. However, the potential of this recombinant antigen still needs to be

confirmed, preferably through an easier and cheaper test, using a larger number of sera, since in this study only 44 samples were tested: eight were positive to toxocariasis and 5 negative. Expression of this antigen using a secretion vector is interesting since it would allow its glycosylation and optimize its purification (Cereghino and Cregg, 2000).

Some authors suggest that there is higher specificity in the use of antigen TES fractions with low molecular mass (Magnaval *et al.*, 1991). In 1998, it was produced a recombinant antigen in *Escherichia coli* corresponding to the 30 kDa protein antigen TES (rTES-30), from the cDNA of larvae of *T. canis*, indicating it as a promising immunodiagnostic tool (Yamasaki *et al.* 2000). Nevertheless, this antigen was also characterized by WB using only 32 sera, where some of them showed cross-reaction with anisakiasis. In 2000, the same research group observed no cross-reaction comparing rTES-30 with native TES through ELISA using 153 sera from patients presenting twenty different helminthiasis (Yamasaki *et al.* 1998). However, this study was carried out in Japan, an area not endemic for *Ascaris lumbricoides* and hookworm (*Ancylostoma* spp. And *Necator americanus*), helminths that share antigens with *Toxocara* spp.

Norhaida *et al.* (2008) explored the possibility of increasing the specificity of the ELISA with rTES-30 by detection of IgG₄. They obtained a sensitivity of 92.3% (24/26) and specificity of 89.6% (103/115), compared with 100% sensitivity and specificity of 55.7% of the commercial ELISA (total IgG). Mohamad *et al.* (2009), besides rTES-30, produced the antigens rTES-26 and rTES-120 in *E. coli*, and tested them by IgG₄-ELISA, obtaining 80% (24/30) and 93% (28/30) of sensitivity and specificity, respectively. On the other hand, the use of combined antigens rTES-30 and rTES-120 increased the sensitivity to 100%. The specificity of the antigens rTES-26, rTES-30 and rTES-120 were 96.2%, 93.9% and 92%, respectively. Although the results of both studies seem promising, the number of sera tested was also low.

In view of the results obtained to date, the use of recombinant antigens in immunodiagnosis of human toxocariasis seems promising, however further studies are needed using a larger panel of sera and more representative of the population evaluated.

Development of new therapies

The treatment options for human toxocariasis are limited and consist in the use of anthelmintics combined with anti-inflammatory drugs (CDC, 2011). There are three reasons for carrying out the treatment of this parasitic disease, firstly to obtain a clinical

resolution; and secondly, the attempt to reduce the number of larvae potentially migrating to the brain and eyes (Pawlowski, 2001). In the ocular toxocariasis it is only indicated the use of anti-inflammatory drugs (Elefant *et al.* 2001). Finally, this infection leads to immunomodulation of the hosts (Mendonça *et al.* 2012), which may suppress the immuneresponse to vaccination against several infections as it occurs with other helminth infections (Van Riet *et al.*, 2007).

There are several anthelmintics available, but none of them has high efficacy (MagnaVal and Glickman, 1993). Most studies that evaluated the efficacy of anthelmintics against *Toxocara* spp. were performed during the 70s and 80s. Currently, there are few studies performed, either in the production and licensing of new products for human, or in the evaluation of existing products on the market in randomized studies (MagnaVal and Glickman, 2006).

The albendazole (ABZ) is the most employed anthelmintic for the treatment of human toxocariasis, although it does not show high effectiveness. This fact justifies the need of developing a new formulation for the treatment of this parasitosis (Satou *et al.* 2003). Studies were performed using liposomes and microparticles in order to increase the solubility rate of ABZ. These agents act as carriers of anthelmintic aiming to release the drug effectively in the target organs (Hrůková and Velebný, 2001). A study on the activity of ABZ encapsulated in liposomes containing PEG (polyethylene glycol) showed a reduction in the number of larvae of *T. canis*, lodged in the brain and liver of mice (Horiuchi *et al.*, 2005). It was also demonstrated high efficacy of PEG-ABZ in the treatment of mice infected with *T. canis*, preventing larval migration to the encephalon. Furthermore, the authors found no signs of intoxication in mice (Leonardi *et al.*, 2009).

Due to the difficulty of treating visceral toxocariasis, it becomes necessary to expand the studies aiming to find alternatives for the control of this helminthiasis. Some phytochemical compounds of the Simaroubaceae family have biotechnological potential and have been evaluated in agriculture, livestock and human medicine. Studies using plant extracts of *Picrasma quassioides* and *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) (Satou *et al.*, 2003) and compounds of β -carboline alkaloids isolated from these extracts (Satou *et al.*, 2005) showed that out of the 17 compounds tested, only one achieved potential for the treatment of toxocariasis when evaluated *in vitro* for nematicidal activity, immunosuppressive and cytotoxicity, however, did not show effectiveness on the number of larvae and larval mobility *in vivo*. Quesada *et al.* (2009) studied the anthelmintic activity

of ether and ethanol extracts of leaves and fruits of *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), and verified that against the adult parasite, the ethanol extract, as well as leaves and fruits, showed more effective activity with a concentration of 4.000 ppm for at least 12 h. Regarding ovicidal activity, there was no significant effect at the timeframe evaluated (five days). Musa *et al.* (2011) observed that the separate administration of the extract of *Nigella sativa* (Ranunculaceae) and the association of *N. sativa* (100 mg/kg) with ABZ (100 mg/kg) induced a reduction in level of inflammation and necrosis in the liver and lung tissues, as well as the levels of liver enzymes (aspartate aminotransferase - AST, alanine aminotransferase - ALT, alkaline phosphatase - ALP) compared to mice of the control group. The results indicated that *N. sativa* has a potent effect in protecting against organ damage induced by infection with larvae of *T. canis*.

The development of drugs which act effectively on the larvae of *T. canis*, lodged in the human body is extremely important for the effective treatment of human toxocariasis. These should be able to eradicate the population of larvae lodged in tissues and not only decrease the intensity of infection, as observed with administration of albendazole, febendazole and mebendazole in experimentally infected (Abo-Shehada and Herbert, 1984; Fok and Kassai, 1998; Delgado *et al.*, 1989; Hrl'kova and Velebný, 2001; Satou *et al.*, 2005; Leonardi *et al.*, 2009). Furthermore, it is necessary that the drug does not show cytotoxic or immunosuppressive activity (Satou *et al.* 2005).

Prevention

Since the 70s, the World Health Organization recommended actions to reduce transmission of *Toxocara* spp. to humans, such as the responsible ownership of dogs and cats in order to prevent soil contamination by parasite eggs, since healthy animals are definitive hosts and considered the main epidemiological links in the chain of human toxocariasis (WHO, 1978). The sanitary education is a slow process, but essential for public awareness (Barriga, 1988), likewise to healthcare professionals and control of stray dogs and cats. Furthermore, only after the performance of the clinical diagnosis supported by specific and reliable laboratory methods, the real importance on human health and the prevalence of this neglected zoonosis (Smith *et al.*, 2009) can be clarified. Unfortunately, even with all the scientific advances, the development of vaccines for the prevention of parasitic diseases remains a challenge to be overcome. To our knowledge, there are no vaccines for use against toxocariasis.

A promising strategy for the prevention of toxocariasis is genetic immunomodulation. Malheiro *et al.* (2008) tested this strategy using mammalian expression vectors carrying unmethylated CpG motifs or IL-12. Unmethylated CpG motifs are potent activators of immunologic system cells (dendritic cells, macrophages and NK cells), stimulating cytokine production via TLR9 signalization (Van Uden and Raz, 1999; Spiegelberg and Raz, 2002; Won Han *et al.*, 2003; Tsalik, 2005). On the other hand, IL-12 is a potent immunomodulator that induces a Th-1 cell differentiation and inhibits Th-2 response, thus inhibiting the synthesis of IgE, eosinophilic inflammation and bronchial hyperresponsiveness (Manetti *et al.*, 1993; Mountford and Pearlman, 1998; Chung and Barnes, 1999). Inoculation of pcDNA3/IL-12 blocked the blood and tissue eosinophilia, although there was no impact on the response in the airways, while pcDNA3/CpG prevented airway hyperresponsiveness, but failed to abolish completely the eosinophilic inflammation induced by *T. canis*. These data suggest that pcDNA3/IL-12 and pcDNA3/CpG have distinct therapeutic benefits in relation to eosinophilia and airway hyperresponsiveness, suggesting a possible association of both in the therapeutic intervention of toxocariasis.

Another promising alternative for the prevention of human toxocariasis is the use of probiotics, live microorganisms that when ingested in adequate amounts can confer benefits to the host (FAO/WHO, 2001). Most studies of probiotics are related to prevention of bacterial diseases (Borchert *et al.*, 2008; Coudeyras *et al.*, 2008). However, some studies in the area of parasitology revealed the reduction of infection reduce and protective effect against protozoan, such as giardiasis and cryptosporidiosis (Guitard *et al.* 2006; Humen *et al.* 2006), as well as helminthiasis such as trichinelose (Bautista-Garfias *et al.*, 2011).

Regarding toxocariasis, significant reduction was observed in the number of larvae recovered from mice with acute toxocariasis treated with the probiotic *Enterococcus faecalis* CECT 7121 for three consecutive days and challenged with 100 or 200 embryonated eggs of *T. canis* (Basualdo *et al.* 2007; Chiodo *et al.*, 2010). The mechanism of action appears to be a consequence of a larvicide effect generated directly by *E. faecalis* CECT 7121, demonstrated *in vitro* after 48 h of incubation (Chiodo *et al.*, 2010). In spite of the confirmed potential in the control of toxocariasis, a probiotic comprising an *E. faecalis* strain may suffer a dubious acceptance by the society, since this organism can be pathogenic (Jett *et al.*, 1994; Elmer *et al.*, 2001). *E. faecalis* is responsible for endocarditis, intra-abdominal abscesses, urinary tract infections, nosocomial infections, bacteremia,

among others (Murray, 1990). Moreover, it is inhibited by many antibiotics, preventing its association with this type of medicine.

In contrast, probiotics consisting of *Saccharomyces boulardii*, a yeast with GRAS status (Generally Recognized As Safe), are not inhibited by antibiotics and have long been used by humans, in prevention as well as treatment of gastrointestinal problems caused by infectious agents (Guslandi *et al.*, 2000). *S. boulardii* caused a reduction in the intensity of infection in mice with acute visceral toxocariasis (36.7%) and chronic (35.9%) (Avila *et al.*, 2012). Instead of exerting a direct mechanism of action, as larvicidal activity, it appears that *S. boulardii* increased intestinal mucosal integrity, hindering the penetration of larvae of *T. canis*. Also, using vertical infection models, *S. boulardii* reduced significantly the number of larvae of *T. canis* transmitted to the progeny and the intensity of infection in latents (unpublished data). Although only two species of probiotic microorganisms have been evaluated, the use of probiotics in the control of human toxocariasis seems promising. Further studies with other probiotic species evaluated individually, in consortium, or associated with anthelmintics should be encouraged.

Given the complexity and difficulty in epidemiological diagnosis and treatment of human toxocariasis, biotechnological approaches can offer alternatives to increase the control of this important and neglected zoonotic disease.

References

1. Abo-Shehada MN, Herbert IV 1984 Anthelmintic effect of levamisole, ivermectin, lbendazole and fenbendazole on larval *Toxocara canis* infection in mice. *Res. Vet. Sci.* **36** (1) 87-91.
2. Alderete JMS, Jacob CMA, Pastorino AC, Elefant GR, Castro APM, Fomin ABF and Chieffi PP 2003 Prevalence of *Toxocara* infection in Schoolchildren from the Butantã Region, São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **98** (5) 593-597.
3. Amaral HL, Rassier GL, Pepe M, Gallina T, Vilella M, Nobre M, Scaini CJ and Berne MEA 2010 Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for Visceral Larva Migrants. *Vet. Parasit.* **174** 115-118.
4. Avila LFC, Conceição FR, Telmo PL, Dutra GF, Santos DG, Martins LHR, Berne MEA, Da Silva PA and Scaini CJ 2012 *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. *Vet. Parasit.* **187** 337-340.

5. Barriga OO 1988 A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis of immunological control. *Vet. Parasitol.* **29** (2-3) 195-234. Review.
6. Basualdo J, Sparo M, Chiodo P, Ciarmela M and Minvielle M 2007 Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. *Ann.Trop.Med. Parasitol.* **101** (6) 559-562.
7. Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodríguez O, Martínez-Gómez F, López MG and Aguilar Figueroa BR 2011 Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organism administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis*. *Parasite* **8** 226-228.
8. Borchert D, Sheridan L, Papatsoris A, Faruq Z, Barua JM, Junaid I, Pati Y, Chinegwundoh F and Buchholz N 2008 Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: review and research perspective. *Indian. J. Urol.* **24** (2) 139-144. Review.
9. Carvalho EAA and Rocha RL 2011 Toxocariasis: visceral larva migrans in children. *J. Pediatr. (Rio J).* **87** (2) 100-110. Review.
10. CDC - Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. 2011. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxocariasis.htm>. Accessed em: 18 de junho, 2011.
11. Cereghino JL and Cregg JM 2000 Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24** (1) 45-66. Review.
12. Chen J, Zhou DH, Nisbet AJ, Xu MJ, Huang SY, Li MW, Wang CR, Zhu XQ 2012 Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect. Genet. Evol.* **12** (7) 1344-1348. Review.
13. Chiodo PG, Sparo MD, Pezzani BC, Minvielle MC and Basualdo JA 2010 In vitro and in vivo effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105** 615-620.
14. Choi D, Lim JH, Choi DC, Paik SW, Kim SH and HUH S 2008 Toxocariasis and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. *The Korean J. Parasitol.* **46** (3) 139-143.
15. Chung KF and Barnes PJ 1999 Cytokines in asthma. *Thorax* **54** 825-857. Review.

16. Coelho FAS, Araújo AJUS, Kanamura HY, Rubinsky-Elefant G and Coêlho MDG 2006 Frequency of anti-Toxocara sp antibodies and socioenvironmental characterization of a rural population in the city of Pindamonhangaba, SP, Brazil. *Ver. Biociên. (Taubaté)* **12** (3-4) 157-164.
17. Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M and Forestier C 2008 and 2009 Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **2008** 1-5.
18. Delgado O, Botto C, Mattei R and Escalante A 1989 Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **83** (6) 621-624.
19. De Savigny DH 1975 *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol.* **61** 781-782.
20. Despommier D 2003 Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* **16** (2) 265-272. Review.
21. Elefant RG, Jacob CMA, Kanashiro EHY and Peres BA 2001 Toxocaríase; in *Diagnóstico Imunológico* 2ed (Brazil: Guanabara Koogan) pp 323-332
22. Elmer GW and McFarland LV 2001 Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **30** 837-854.
23. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), Joint FAO/WHO Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001
<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>
Accessed em, 11 jun 2012.
24. Fisher M 2003 *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends Parasitol.* **19** 167-170.
25. Fok E and Kassai T 1998 *Toxocara canis* infection in the paratênico host: a study on the chemosusceptibility of the somatic larvae in mice. *Vet. Parasitol.* **74** (2-4) 243-259.
26. Fong MY and Lau YL 2004 Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* **92** (2) 173-176.

27. Guitard J, Menotti J, Desveaux A, Alimardani P, Porcher R, Derouin F and Kapel N 2006 Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. *Parasitol. Res.* **99** (5) 522-527.
28. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M and Testoni PA 2000 *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* **45** 1462-1464.
29. Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K and Nikaido T 2005 The effect of free and polyethyleneglycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet. Parasitol.* **129** (1-2) 83-87.
30. Hotez PJ and Wilkins PP 2009 Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3** (3) e400 Review.
31. Hrl'kova G and Velebný S 200. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. *J. Helminthol.* **75** (2) 141-146.
32. Humen MA, De Antoni GL, Benyacoub J, Costas ME, Cardozo MI, Kozubsky L, Saudan K, Boenzli-Bruand A, Blum S, Schiffrin EJ and Pérez PF 2005 *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* in Vivo. *Infect. Immun.* **73** (2) 1265-1269.
33. Jett BD, Huycke MM and Gilmore MS 1994 Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **7** (4) 462-478. Review.
34. Jin Z, Akao N and Ohta N 2008 Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. *Parasitol. Int.* **57** 495-498.
35. Leonardi D, Echenique C, Lamas MC and Salomon CJ 2009 High efficacy of albendazole-PEG 6000 in the treatment of *Toxocara canis* larva migrans infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **64** (2) 375-378.
36. Maffrand R, Avila-Vazquez M, Princich D and Alasia P 2006 Congenital ocular toxocariasis in a premature neonate. *An.Pediatr.(Barc.)*, **64** (6) 595-604.
37. Magnaval JF and Glickman LT 2006 Management and treatment options for human toxocariasis; in C.V. Holland and H.V. Smith (eds) *Toxocara the enigmatic parasite* (United Kingdom: CABI Publishing).
38. Magnaval JF and Glickman LT 1993 Zoonotic roundworm infections. *Infect. Dis.Clin. North Am.* **7** (3) 717-732. Review.

39. Magnaval JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP and de Larrard B 1991 Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.* **77** (8) 697-702.
40. Malheiro A, Aníbal FF, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Perini A, Martins MA, Medeiros AI, Turato WM, Acencio MP, Brandão IT, Nomizo A, Silva CL and Faccioli LH 2008 pcDNA-IL-12 vaccination blocks eosinophilic inflammation but not airway hyperresponsiveness following murine *Toxocara canis* infection. *Vaccine* **26** (3) 305-315.
41. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinini MP, Maggi E, Trinchieri G and Romagnani S 1993 Natural killer cell stimulatory factor Interleukin 12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177** 1199-1204.
42. Mendonça LR, Veiga RV, Dattoli VC, Figueiredo CA, Fiaccone R, Santos J, Cruz ÁA, Rodrigues LC, Cooper PJ, Pontes-de-Carvalho LC, Barreto ML, Alcantara-Neves NM 2012 *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6** (11) e1886.
43. Mohamad S, Azmi NC and Noordin R 2009 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). *J. Clin. Microbiol.* **47** (6) 1712-1717.
44. Morimatsu Y, Akao N, Akiyoshi H, Kawazu T, Okabe Y and Aizawa H 2006 A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75** 303-306.
45. Mountford AP and Pearlman E 1998 Interleukin-12 and the host response to parasitic helminths; the paradoxical effect on protective immunity and immunopathology. *Parasite immunol.* **20** 509-517. Review.
46. Murray BE 1990 The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3** (1) 46-65. Review.
47. Musa D, Senocak G, Borazan G, Altas P, Ozgonul A, Sogut O and Güldür ME 2011 Effects of *Nigella sativa* and albendazole alone and in combination in *Toxocara canis* infected mice. *J Pak Med Assoc.* **61** (9) 866-870.

48. Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM and Fong MY 2005 Comparison of IgG ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop.* **93** (1) 57-62.
49. Norhaida A, Suharni M, Liza-Sharmini AT, Tuda J and Rahmah N 2008 rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **102** (2) 151-160.
50. Othman AA 2012 Therapeutic battle against larval toxocariasis: Are we still far behind? *Acta Trop.* **124** (3) 171-178. Review.
51. Paludo ML, Falavigna DLM, Elefant GR, Gomes ML, Baggio MLM, Amadei LB and Falavigna-Guilherme AL 2007 Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **49** (6) 343-348.
52. Pawlowski Z 2001 Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol.* **75** 299-305.
53. Peixoto PL, Nascimento E, Cançado GGL, Miranda RRC, Rocha RL, Araújo RN and Fujiwara RT 2011 Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106** 200-206.
54. Perez BA and Abe-Jacob CM 1996 Toxocaríase; in Ferreira AW and ÁVILA SLM (eds.) *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes* (Brazil: Ed. Guanabara Koogan) pp 208-216.
55. Pinelli E and Aranzamendi C 2012 *Toxocara* infection and its Association with Allergic Manifestations. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* **12** (1) 33-44. Review.
56. Quesada LF, Osorio JC and Bilbao M 2009 Efecto antiparasitario de los extractos etanólicos y etéreos de *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), frente a parásitos de clase nematodos (*Toxocara cati* y *Toxocara canis*). *Infectio.* **13** (4) 259-267.
57. Reiterová K, Tomasovicová O and Dubinsky P 2003 Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunol.* **25** (7) 361-368.
58. Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE and Jiménez S 2010 Diagnostico de la toxocarosis humana. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica* **27** (4) 613-20. Review.

59. Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH and Ferreira MU 2010 Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *An. Trop. Med. Parasitol.* **104** (1) 3–23. Review.
60. Satou T, Akao N, Koike K, Watanabe I, Futija K and Nikaido T 2003 A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (I), (II). *Nat. Med.* **57** 23-27.
61. Satou T, Horiuchi A, Akao N, Koike K, Futija K and Nikaido T 2005 *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst α -carboline alkaloids in vivo and mouse studies. *Exp. Parasitol.* **110** (2) 134-139.
62. Schoenardie ER, Scaini CJ, Brod CS, Pepe MS, Villela MM, McBride AJ, Borsuk S and Berne ME 2012 Serodiagnosis of visceral larva migrans in children of south of Brazil. *J. Parasitol.* [epub ahead of print]
63. Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval J-F, Schantz P and Maizels R 2009 How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* **25** (4) 182-188. Review.
64. Soares FJP, Rizzo MC, Solé D and Naspitz CK 1991 Larva Migrans Visceral em Bebê Chiador. *J Pediatr (Rio J)* **67** (3/4) 119-121.
65. Spiegelberg HL and Raz E 2002 DNA-based approaches to the treatment of allergies. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4** (1) 64-71. Review.
66. Tsalik EL 2005 DNA-based immunotherapy to treat atopic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **95** (5) 403-410. Review.
67. Torgerson PR and Budke CM 2006 Economic Impact of *Toxocara spp.*; in Holland CV and Smith HV (eds) *Toxocara the enigmatic parasite*. (UK: CABI Publishing) Cap 19.
68. Van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M 2007 Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. *Immunobiology* **212** 475–490.
69. Van Uden J and Raz E 1999 Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104** 902-910. Review.
70. Wickramasinghe S, Yatawara L, Nagataki M, Takamoto M, Watanabe Y, Rajapakse RP, Uda K, Suzuki T and Agatsuma T 2008 Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for

- serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitol. Res.* **103** 853-858.
71. Won Han S, Moraes JZ, Silva CL, Chammas R and Rodrigues MM 2003 DNA vaccine; in Yury E, Khudyakov, Howard A, Fields (eds), *Artificial DNA, methods and applications* (Florida: CRC Press) pp 329-361.
 72. World Health Organization - WHO 1978 Action to reduce human health hazards arising from animals. *WHO Chronicle.* **32** 307-310.
 73. Yamasaki H, Araki K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R and Aoki T 2000 Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J. Clin. Microbiol.* **38** (4) 1409-1413.
 74. Yamasaki H, Taib R, Watanabe Y, Mak JW, Zasmy N, Araki K, Lim PKC, Kita K and Aoki T 1998 Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Intern.* **47** (3) 171-181.

2.2 Artigo 2

Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis*
produzida em *Escherichia coli*

Paula de Lima Telmo, Carlos Eduardo Pouey da Cunha, Gabriela Torres Mattos,
Gabriel Baracy Klafke, Carlos James Scaini, Fabricio Rochedo Conceição

Artigo segundo as regras da Revista do Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo ao qual será submetido.

Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis* produzida em *Escherichia coli*

PAULA DE LIMA TELMO¹, CARLOS EDUARDO POUEY DA CUNHA¹, GABRIELA TORRES MATTOS², GABRIEL BARACY KLAFKE^{1,2}, CARLOS JAMES SCAINI², FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO¹

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

²Faculdade de Medicina/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande, General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

*Corresponding author: Fabricio Rochedo Conceição - Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil Tel.: 55 53 32757583; fax: 55 53 32757350. E-mail: fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

RESUMO:

A toxocaríase é uma zoonose difundida em todo o mundo constituindo um relevante problema de saúde coletiva, porém negligenciado. Antígenos recombinantes vêm sendo testados, buscando um melhor alvo para ser utilizado no desenvolvimento de métodos diagnósticos para Toxocaríase Humana. Este trabalho objetivou a expressão e a caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis* em *Escherichia coli* (rTES30E). A sequência gênica codificante para TES-30, produzida sinteticamente, foi clonada no vetor de expressão pAE, expressa em *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, purificada e caracterizada por *western blot* (WB) com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xhis. A proteína foi avaliada por Ensaio Imunoenzimático (ELISA-IgG) frente ao antígeno TES

nativo, com soros de camundongos infectados experimentalmente, apresentando 100% de especificidade e sensibilidade, confirmando, assim, a antigenicidade da rTES30E e indicando seu potencial no imunodiagnóstico da toxocaríase.

PALAVRAS-CHAVE: Toxocaríase, *T. canis* IgG, proteína recombinante, TES30, diagnóstico.

ABSTRACT:

Human toxocariasis is a widespread zoonosis in the world and is a significant on public health problem, but neglected. Recombinant antigens are being tested, is promising for improving the specificity of the diagnosis to human toxocariasis. This study aimed to expression and characterization of the TES30 protein of *Toxocara canis* in *Escherichia coli* (rTES30E). The gene sequence coding for TES30, produced synthetically, was cloned into the expression vector pAE, expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star, purified and characterized on western blot (WB) with monoclonal antibody (MAb) anti-6xHis. The protein was measured by ELISA-IgG against TES antigen with experimentally infected mice sera, recognises 100% specificity and 100% sensitivity, thereby confirming the antigenicity of rTES30E and indicating its potential in toxocariasis immunodiagnostic.

KEYWORDS: Toxocariasis, *Toxocara canis*, recombinant protein, TES30, *Escherichia coli*, diagnosis

A toxocaríase é uma zoonose cosmopolita (Hoffmeister *et al.*, 2007), constituindo-se em um importante problema de saúde coletiva (Haralambidou *et al.*, 2005), porém, é mais um exemplo de parasitose negligenciada, resultando em taxas de prevalências subestimadas (Torgerson e Budke, 2006).

Embora se manifeste majoritariamente de forma assintomática (Guardis *et al.*, 2002), a toxocaríase pode atingir diferentes órgãos e se manifestar de diferentes formas (Bächli *et al.*, 2004; Akao e Ohta, 2007), refletindo a carga parasitária, o trajeto migratório das larvas, grau inflamatório desenvolvido, bem como a resposta imune do indivíduo. (CDC, 2011).

O diagnóstico da toxocaríase humana é feito por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto, associado ao antígeno de excreção e secreção de *Toxocara canis* (TES) (De Savigny *et al.*, 1975; Magnaval *et al.*, 1991; CDC, 2011), com adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* sp., visando melhorar a especificidade na pesquisa de IgG anti-*T. canis* (De Savigny e Tizard, 1977; De Savigny *et al.*, 1979). O antígeno TES é obtido a partir do cultivo de larvas de *T. canis* (Alcântara-Neves *et al.*, 2008), necessitando de mão de obra qualificada (Peixoto *et al.*, 2011), além de ser laborioso, dispendioso e de produção limitada (Mohamad *et al.*, 2009). Devido a estas dificuldades, antígenos recombinantes vêm sendo testados (Yamasaki *et al.* 1998, 2000; Coelho *et al.* 2006; Wickramasinghe *et al.* 2008; Mohamad *et al.* 2009), visando o aperfeiçoamento do imunodiagnóstico da toxocaríase, buscando reduzir principalmente a reação cruzada com anticorpos induzidos por outras infecções helmínticas (Yamasaki *et al.*, 2000).

Alguns autores acreditam que as frações de menor massa molecular do antígeno TES apresentam maior especificidade (Magnaval *et al.*, 1991), e que a fração protéica de 30 kDa, uma das mais abundantes na superfície larval (Page *et al.* 1992), apresenta alta sensibilidade (Maizels, 2013), sendo um possível alvo importante para imunodiagnóstico. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo clonar e expressar a proteína recombinante

TES30 em *Escherichia coli*, bem como caracterizar o potencial diagnóstico desta proteína frente a soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. canis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Clonagem do gene sintético

O gene sintético para a *tes30*, com 645 pb, foi desenhado com sítios de enzimas de restrição, *Bam*HI e *Kpn*I, para clonagem no vetor de expressão em *E. coli* pAE. A sequência depositada no GenBank (AB009305) foi usada no *design* do gene sintético. A síntese do gene e clonagem no vetor pUC18 foi realizada pela empresa Epoch Biolabs® (USA). O vetor pUC18 contendo o gene sintético foi digerido com as enzimas de restrição, liberando o inserto. O vetor de expressão em *E. coli* pAE também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, nas condições indicadas pelo fabricante, para posterior ligação do inserto. Ambos, inserto e vetor pAE, foram purificados entre uma digestão e outra mediante o *kit* de purificação e concentração de Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK). Após as purificações, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da eficácia das reações. O inserto foi purificado do gel de agarose 0,6%, utilizando o *kit* supracitado. Após a purificação e quantificação, o gene sintético foi inserido no vetor pAE mediante ligação com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen, UK) a 16°C por 40 min. Para seleção dos clones recombinantes, *E. coli* TOP10F foi transformada por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001) com o produto final da reação de ligação e cultivada em meio Luria-Bertani (LB) sólido com 100 μ g/ml de ampicilina por 14 a 16 h em estufa a 37°C. Posteriormente, o DNA plasmidial de cada colônia, extraído com fenolclorofórmio, foi analisado em gel de agarose a 1%. As colônias recombinantes foram cultivadas em 3 ml de meio LB líquido com 100 μ g/ml de ampicilina, sendo posteriormente extraídos os plasmídeos com o *kit* ilustrado plasmidPrep[®] Mini Spin Kit

(GE Healthcare, UK). Para confirmação das colônias recombinantes utilizou-se as mesmas endonucleases, *Bam*HI e *Kpn*I, que geraram dois fragmentos de tamanhos conhecidos observados em gel de agarose, selecionadas com o auxílio do software comercial Vector NTI Advance[®] 11 (Invitrogen, USA).

Expressão e purificação da proteína recombinante

Com a confirmação de clones recombinantes, plasmídeos contendo o inserto foram inseridos em *E. coli* BL21 (DE3) Star por choque térmico (Sambrook e Russel, 2001) a fim de expressar a proteína correspondente. O produto da transformação foi cultivado em caldo LB com 100 µg/ml de ampicilina em agitador orbital (200 rpm e 37°C), até atingir a DO₆₀₀ 0,6-0,8. Para indução da expressão utilizou-se IPTG 5 mM (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo) e o cultivo incubado em agitador orbital a 250 rpm a 37°C por 3h. *Pellets* de alíquotas de 1 ml foram usados para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 12% para verificação da expressão. *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada e não induzida foi usada como controle negativo da expressão. Após verificar a expressão da proteína recombinante, um clone foi cultivado em larga escala (500 ml). No teste de solubilidade, constatou-se que a proteína recombinante foi expressa na forma de corpos de inclusão. Para purificação da proteína, os corpos de inclusão foram lavados cinco vezes com PBS e tratados com PBS contendo 8 M de uréia sob agitação por 48 h a 4°C, visando a solubilização da proteína. A proteína recombinante foi purificada mediante cromatografia de afinidade com coluna de Ni⁺²-Sepharose no sistema ÄKTA Prime[™] plus (GE Healthcare, UK). Após a purificação, a proteína foi diluída 1:2 em PBS e dialisada por 48 h em 1 l de PBS com Ureia 4 M, seguida de diálise gradual, lenta, em PBS com Triton X-100 a 0,05% (v/v). A proteína foi quantificada por BCA[™] Protein Assay (USA), conforme as instruções do fabricante, utilizando BSA como padrão.

Caracterização da proteína recombinante por SDS-PAGE e Western Blotting

A caracterização da proteína recombinante foi feita por SDS e WB. Primeiramente, foi realizada a eletroforese em SDS-PAGE a 12%, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e gel de empilhamento na concentração de 5% em tampão Tris/HCl 1,M, pH 6,8, segundo Sambrook e Russel (2001). O antígeno foi desnaturado em tampão de amostra com condições redutoras (SDS a 10%; azul de bromofenol a 0,5%; Tris-HCl 0,25M pH 6,8; glicerol a 50%; • mercaptoetanol a 3%). A corrida eletroforética foi realizada em sistema de eletroforese Mini-PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), contendo tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,250M e SDS a 0,1%) e voltagem constante de 150 V. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250. Para o WB, após a separação das proteínas em gel de SDS-PAGE, foi realizada a transferência em Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) da proteína para membrana de nitrocelulose, a qual foi bloqueada com leite em pó a 5% em PBS-T por 14-18 h, lavada com PBS-T e incubada com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (MAb anti-6xHis - Sigma), na diluição 1:6000, sob agitação constante por 1 h. Após três lavagens, a membrana foi incubada com conjugado anti-camundongo e revelada por *kit* ECL de Quimioluminescência e Diaminobenzidina 3, 3' (DAB) acrescido de peróxido de hidrogênio. A reação com o cromógeno foi parada com água destilada.

Antigenicidade da proteína recombinante por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Indireto

Os soros dos camundongos inoculados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis* foram provenientes de soroteca do Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Rio Grande (FURG). O ELISA indireto foi feito com amostras de 40 camundongos com sorologia positiva e 10 com sorologia negativa para larvas de *T. canis*. A confirmação da positividade foi realizada pela recuperação de larvas

do nematoide em órgãos e na musculatura esquelética (carcaça) dos camundongos infectados experimentalmente, utilizando o método de digestão tecidual descrito por Wang e Luo (1998). O mesmo método foi empregado para confirmar a negatividade nos camundongos não infectados experimentalmente. Para avaliar a especificidade, foram utilizados soros de cinco crianças positivas para enteroparasitos: *Ascaris lumbricoides* (2), *Trichuris trichiura* (2) e *Giardia lamblia* (1).

O ELISA indireto foi realizado em uma microplaca de ELISA (TPP) previamente sensibilizada com o antígeno recombinante, na concentração de 2 µg/ml, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 a 9,8, por 3 h a 37° C. Os sítios livres foram bloqueados com leite em pó a 5%, durante 1 h, a 4°C. Os soros controle positivo e negativo foram testados, em duplicatas, na diluição de 1:50, e o conjugado anti-camundongo IgG de coelho (Sigma) na diluição de 1:1.000, em PBS pH 7,2, contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Tanto os soros como o conjugado foram incubados durante 45 min a 37°C. Como cromógeno foi utilizado a ortofenilenodiamina (OPD), na concentração de 0,4 mg/ml, em tampão citrato-fostato pH 4,0, acrescido de peróxido de hidrogênio a 0,1%, sendo realizada leitura (450 nm) 15 minutos após a adição do OPD.

Para estabelecer o ponto de corte (*cut off*) no ELISA indireto utilizando o antígeno TES, foram usados os resultados da absorbância dos soros negativos de camundongos Balb/c coletados antes (dia zero) da inoculação de ovos de *T. canis*. A média aritmética da absorbância destes soros foi acrescida de dois desvios padrões (DP), portanto, os valores iguais ou superiores a este foram considerados positivos para a presença de anticorpos anti-*T. canis*. Ainda, o *cut off* foi confirmado pela Curva de Características de Operação do Receptor (ROC), onde foi determinada a relação entre sensibilidade e especificidade da proteína recombinante rTES30E em comparação ao antígeno nativo TES.

RESULTADOS

Clonagem do gene sintético

O DNA plasmidial de possíveis clones recombinantes, identificados em uma triagem rápida, foi extraído e digerido com endonucleases, confirmando a presença do inserto.

Na figura 1, é possível observar o clone recombinante pAE/*tes30*, bem como a liberação do inserto de 645 pb por caracterização enzimática.

Expressão e purificação da proteína recombinante

A expressão da proteína rTES30E foi avaliada por eletroforese em SDS-PAGE 12%. Pode ser observada na Figura 2 que houve expressão de uma proteína com aproximadamente 21 kDa, massa molecular correspondente rTES30E predita pelo programa Vector NTI Advance 11 (Invitrogen, UK). Porém, outra proteína de aproximadamente 60 kDa foi evidente, sugerindo que a proteína formou multímeros. A expressão da proteína recombinante foi confirmada pelo WB utilizando anticorpos MAb anti-6xHis, na diluição 1:6000, que reconheceu a proteína recombinante devido a presença da cauda de polihistidinas, apresentando uma banda compatível com a proteína rTES30E (Figura 3). Após o processo de solubilização da rTES30E em tampão contendo 8 M de uréia, para auxiliar no rompimento celular e a solubilização da mesma que se encontrava na forma de corpos de inclusão, a proteína recombinante foi purificada mediante cromatografia de afinidade em coluna de Ni^{+2} -Sephrose (GE Healthcare, UK), no sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime, apresentando um grau de pureza bastante satisfatório (dados não mostrados). O antígeno recombinante foi dialisado e rendeu aproximadamente 0.390 mg de rTES30E por litro de cultivo.

ELISA indireto

O antígeno recombinante rTES30E apresentou 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (IC a 95% = 0,928-1,000) no ELISA, frente ao antígeno nativo TES, usando

$\text{ócut off} = 0,2$, correspondendo a média das absorbâncias de soros negativos acrescida de 2 desvios padrão, e confirmado como melhor ponto de corte pela Análise ROC (figura 4). Não houve reação cruzada quando confrontada com soros positivos para outras parasitoses (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

O largo espectro patológico (Strube *et al.*, 2013), a sintomatologia oculta (Magnaival *et al.*, 2001) e a dificuldade do diagnóstico definitivo da toxocaríase humana (Elefant *et al.*, 2001; Watthanakulpanich, 2010), estimulam a busca do aperfeiçoamento do diagnóstico desta parasitose tecidual.

Apesar do ELISA-IgG associado ao TES ser o método padrão utilizado para o diagnóstico sorológico (Magnaival *et al.*, 2001), este método apresenta em torno de 78% de sensibilidade e 90% de especificidade (Glickman *et al.*, 1986; Smith, 1993; CDC, 2011). Em países tropicais, devido a exposição a outras helmintoses e a possíveis reações cruzadas, esta especificidade diminui consideravelmente (Lynch *et al.*, 1988; Nunes *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2003; Watthanakulpanich *et al.*, 2008), sendo necessária adsorção prévia com antígeno somático de *Ascaris* spp. (De Savigny *et al.*, 1979; Elefant *et al.*, 2006).

Com o advento da biotecnologia, proteínas recombinantes vêm sendo focadas como alvos importantes para incrementar o imunodiagnóstico da toxocaríase. Entre os diversos sistemas de expressão heterólogos de proteínas disponíveis hoje, o uso da bactéria Gram-negativa *E. coli* continua a opção mais utilizada devido ao seu rápido crescimento em alta densidade de cultura, baixo custo, e o amplo conhecimento adquirido sobre a sua genética (Schumann e Ferreira, 2004). Neste estudo, a fração TES30 de *T. canis* foi clonada e

expressa com eficiência em *E. coli*, partindo de um gene sintético, o qual otimizou a expressão da proteína.

E. coli é o procarioto mais utilizado como sistema de expressão para produção de altos níveis de proteínas heterólogas (Hannig e Makrides, 1998). Em concordância, o presente trabalho apresentou um ótimo rendimento protéico, 390 mg de rTES30E por litro de cultivo, em aproximadamente uma semana, demonstrando vantagem em relação a produção do TES nativo, no qual durante o cultivo, cada larva de *T. canis* produz cerca de 200 pg de proteína de E/S por dia (Meghji e Maizels, 1986), demandando de 3 a 4 meses de cultivo larval (Sugane, 1983). Ainda, existe variação nas concentrações protéicas entre cada partida produzida do TES (Nunes, 1996), devido a diferentes concentrações de larvas nos cultivos.

No presente estudo, além da expressão da proteína de massa molecular esperada, predita pelo programa Vector NTI Advance 1, outra proteína de aproximadamente o triplo da massa, ficou evidente em SDS-PAGE, sugerindo a formação de multímeros. Este fato provavelmente ocorreu pelo fato da proteína ter perdido a estabilidade durante o congelamento, porém a sororeatividade da mesma foi mantida.

A cromatografia de afinidade foi escolhida para a purificação da proteína recombinante rTES30E, devido a mesma apresentar uma cauda de poli-histidina, podendo confirmar a expressão da mesma pelo WB utilizando anticorpos MAb anti-6xHis. Esse método apresenta algumas vantagens, como a ligação específica e reversível da proteína alvo na coluna, além de alta seletividade, resultando em eluições de alta pureza (Terpe, 2003).

A formação de corpos de inclusão é um grande obstáculo na expressão heterólogas de proteínas na forma solúvel e funcional (Ventura, 2005), e uma frequente consequência de altos níveis de produção de proteínas no citoplasma (Hannig e Makrides, 1998). A agregação de proteínas recombinantes está envolvida com a presença limitada de

chaperonas em altos níveis de expressão, onde uma exacerbada quantidade de proteína heteróloga é produzida, conduzindo a sua aglomeração (Baneyx, 1999). Isto acontece pela interação intermolecular entre as superfícies hidrofóbicas expostas ocorrer antes da conformação final da proteína estar completa (Corchero *et al.*, 1996; Sørensen e Mortensen, 2005), podendo interferir na atividade biológica da proteína. Além disso, para solubilizar os corpos de inclusão é necessário utilizar desnaturantes como a uréia, levando a perda de epítomos conformacionais, podendo influenciar na imunoreatividade (Chen, 2011, Demain e Vaishnav, 2009, Maizels, 2013), e dificultar a purificação e a diálise, devido às altas concentrações destes desnaturantes utilizadas (Hannig e Makrides, 1998). Contudo, os resultados do presente trabalho entram em discordância com estes dados, pois a proteína rTES30E foi submetida aos mesmos processos e apresentou 100% de sensibilidade e de especificidade. Ainda, a formação dos agregados protéicos, facilita o isolamento das proteínas heterólogas, além de proteger contra a ação de proteases (Hannig e Makrides, 1998).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo representam uma contribuição importante na busca de um candidato para um diagnóstico com maior acurácia para a toxocaríase humana, pois a proteína caracterizada tem potencial antigênico, como evidenciado através do teste ELISA-IgG com o antígeno recombinante em comparação ao antígeno nativo.

SUPORTE FINANCEIRO

Agradecemos ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro concedido aos autores deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akao, N., Ohta, N. (2007). Toxocariasis in Japan. *Parasitology International* 56, 87-93.
- Alcântara-Neves, N. M., Santos, A. B., Mendonça, L. R., Figueiredo, C. A. V. and Pontes-de-Carvalho, L. (2008). An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. *Experimental Parasitology* 119, 349-51.
- Bächli, H, Minet, JC, Gratzl, O. (2004). Cerebral toxocariasis; a possible cause of epileptic seizure in children. *Childs Nervous System* 20 (7), 468-72.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 411-21.
- CDC -. Centers for Disease Control and Prevention (2011). *Toxocariasis*. Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- Coelho, F. A. S., Araújo A. J. U. S, Kanamura H. Y., Rubinsky-Elefant, G. and Coelho M. D. G. (2006). Frequency of anti-*Toxocara* sp antibodies and socioenvironmental characterization of a rural population in the city of Pindamonhangaba, SP, Brazil. *Revista Biociências (Taubaté)* 12 (3-4), 157-164.
- Corchero, J.L., Viaplana, E., Benito, A., Villaverde, A. (1996). The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *Journal of Biotechnology*, 48, 191-200.
- De Savigny, D.H. (1975). *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *The Journal of Parasitology* 61, 781-782.

- De Savigny, D.H., Tizard, I.R. (1977). Toxocaral Larva Migrans: The use of Larval Secretory Antigens in Hemagglutination and Soluble Antigens Fluorescent Antibody tests. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71 (6), 501-507.
- De Savigny, D.H., Voller, A., Woodruff, A.W. (1979) Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Pathology* 32, 284-288.
- Elefant G.R., Jacob C.M.A., Kanashiro E.H.Y. and Peres B.A. (2001). Toxocaríase; in *Diagnóstico Imunológico 2ed* (Brazil: Guanabara Koogan) pp 323-332
- Elefant G.R., Shimizu S.H., Sanchez M.C., Jacob C.M., Ferreira A.W. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. (2006). *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 20 (4), 164-172.
- Glickman, L.T., Schantz, P.M., Grieve, R.B. (1986). *Immunodiagnosis of parasitic diseases: helminthic diseases*. In: Walls, K.W., Schantz, P.M., editors. *Toxocariasis*. New York: E.U.A. Academic Press Inc. p. 201-31.
- Guardis, M.D.V., Radman, N.E., Burgos, L., Fonrouge, R.D., Archelli S.M. (2002). *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. *Parasitology Latinoamericana* 57, 46 - 49.
- Hannig, G., Makrides, S.C. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech*. 16, 54-60.
- Haralambidou, S., Vlachaki, E., Ioannidou, E., Milioni, V., Haralambidis, S., Klonizakis, I. (2005) Pulmonary and myocardial manifestations due to *Toxocara canis* infection. *European Journal of Internal Medicine* 16, 601-602.
- Hoffmeister, B., Glaeser, S., Flick, H., Pornschlegel, S., Suttorp, N., Bergmann, F. (2007). Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76 (3), 600-602.

- Ishida, M.M., Rubinsky-Elefant G., Ferreira A.W., Hoshino-Shimizu S., Vaz A.J. (2003). Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Tropica* 89, 73-84.
- Lynch, N., Wilke, S.L., Hodgen, A.N., Turner, K. 1988. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunology*. 10, 323-337.
- Maizels, R. M. (2013). *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>. Article in Press.
- Maizels, R.M., De Savigny, D., Ogilvie, B.M. (1984). Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunology* 6, 23-37.
- Magnaaval, J.F., Fabre, R., Maurières, P., Charlet, J. P. and De Larrard, B. (1991). Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research* 77 (8) 697-702.
- Meghji, M., Maizels, R.M. (1986). Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 18, 155-170.
- Mohamad, S., Azmi, N. C. and Noordin, R. (2009). 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), 1712-1717.

Nunes, C.M. (1996). Imunodiagnóstico da larva *migrans* visceral através de um método de ELISA indireto competitivo. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 62p.

Nunes, C.M., Tundisi, R.N., Garcia, J.F., Heinemann, M.B., Ogassawara, S., Richtzenhain, L.J. (1997). Crossreactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39, 253-256.

Page, A.P., Hamilton, A.J., Maizels, R.M. (1992). *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. *Experimental Parasitology* 75, 56-71.

Peixoto, P. L., Nascimento, E., Cançado, G.G.L., Miranda, R.R.C., Rocha, R.L., Araújo, R.N. and Fujiwara, R.T. (2011). Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106, 200-206.

Roldán, W.H., Espinoza, Y.A. (2009). Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (3), 411-418.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning ñ A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.

Schumann, W. and Ferreira, L.C.S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *General Molecular Biology* 27, 442-53.

Smith, H.V. (1993). *Antibody reactivity in human toxocariasis*. In: Lewis, J., Maizels, R.M. (Eds.), *Toxocara and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives*. Institute of Biology: London, UK. pp 91-109.

- Sørensen, H.P., Mortensen, K.K. (2005). Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115, 113-28.
- Strube, C., Heuer, L., Janacek, E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>. Article in press.
- Sugane, K., Oshima, T. (1983). Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology* 50 (1), 113-120.
- Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 523-33.
- Torgerson, P.R. and Budke, C.M. (2006). Economic Impact of *Toxocara* spp. Cap. 19. In: C.V. Holland and H.V. Smith (eds.), *Toxocara the enigmatic parasite*. CABI Publishing: Oxfordshire, UK.
- Ventura, S. (2005). Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microbial Cell Factories* 4, 11, 2005.
- Wang, G.X., Luo, Z.J. 1998. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *The Journal of Helminthology* 72, 183-184.
- Watthanakulpanich, D., Smith, H.V., Hobbs, G., Whalley, A.J., Billington, D. (2008). Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Tropica* 106, 90-95.
- Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R. P., Uda, K., Suzuki, T. and Agatsuma, T. (2008). Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitology Research* 103, 853-858.
- Yamasaki, H., Taib, R., Watanabe, Y., Mak, J.W., Zasmy, N., Araki, K., Lim, P.K.C., Kita, K. and Aoki, T. (1998). Molecular characterization of a cDNA encoding an

excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology International* 47 (3), 171-181.

Yamasaki, H., Araki, K., Lim, P.K.C., Zasmy, N., Mak, J.W., Taib, R. and Aoki, T. (2000). Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (4), 1409-1413.

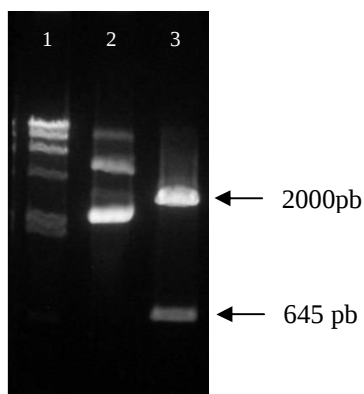


Figura 1. Gel de agarose 1% demonstrando a construção do vetor pAE/*tes30* digerido com enzimas de restrição, mostrando a liberação do inserto de 645pb. 1. Marcador !!Hind III (Invitrogen); 2. Vetor pAE/*tes30*; 3. Liberação do inserto *tes30*

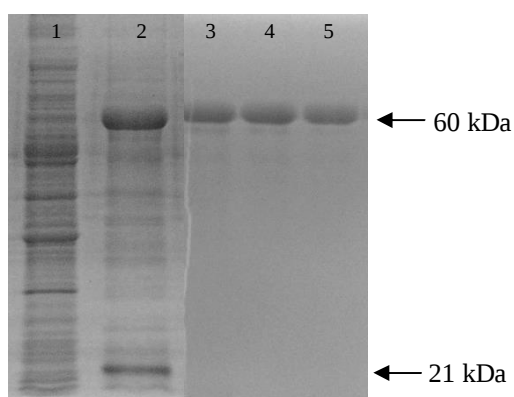


Figura 2. Expressão da proteína recombinante rTES30E em *E. coli* em SDS-PAGE 12%. 1. extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 2. extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*tes30*; 3-5. Produto da purificação da rTES30E por ÄKTA prime

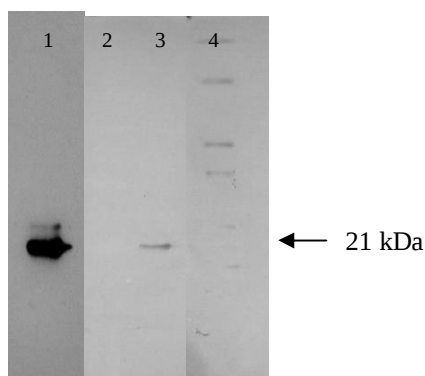


Figura 3. WB demonstrando a confirmação da expressão da proteína rTES30E frente ao MAb anti-6xHis, revelado com Quimioluminescência e com DAB. 1. rTES30E (21 kDa) revelada por Quimioluminescência; 2. extrato de *E. coli* BL21 (DE3) Star não transformada; 3. rTES30E (21 kDa) revelada por DAB; 4. marcador pré-corado Rainbow Ladder;

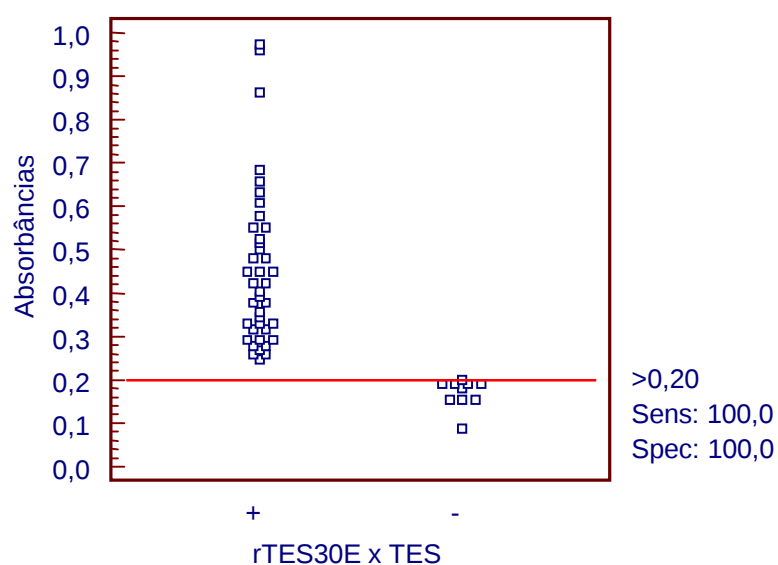


Figura 4. Diagrama de Características de Operação do Receptor para comparar o antígeno recombinante rTES30E e o antígeno nativo TES frente a soro de camundongos infectados experimentalmente.

2.3 Artigo 3

Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis*
produzida em *Pichia pastoris*

Paula de Lima Telmo, Michele Pepe Cerqueira, Paula Finger, Carolina
Magalhães, Gabriela Torres Mattos, Patrícia Diaz, Carlos James Scaini, Fabricio
Rochedo Conceição

Artigo segundo as regras da Revista Parasitology (Cambridge) à qual será
submetido.

Clonagem, expressão e caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis* produzida em *Pichia pastoris*

PAULA DE LIMA TELMO^{1Ψ}, MICHELE PEPE CERQUEIRA^{1Ψ}, PAULA FINGER¹, CAROLINA MAGALHÃES¹, GABRIELA TORRES MATTOS², PATRÍCIA DIAZ¹, CARLOS JAMES SCAINI², FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO¹

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

²Faculdade de Medicina/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande, General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

*Corresponding author: Fabricio Rochedo Conceição - Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil Tel.: 55 53 32757583; fax: 55 53 32757350. E-mail: fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

^Ψ Estes autores contribuíram igualmente na execução e redação do trabalho

RESUMO:

A toxocaríase é uma importante zoonose parasitária que constitui um relevante problema de saúde coletiva. Antígenos recombinantes têm sido avaliados como bons alvos para melhorar a eficácia no imunodiagnóstico da toxocaríase. Este trabalho objetivou a expressão e a caracterização da proteína TES30 de *Toxocara canis* em *Pichia pastoris* (rTES30P). Células competentes de *P. pastoris* KM71H (Mut^S) foram transformadas por eletroporação com o vetor recombinante (pPICZ^UB/tes30). Os clones recombinantes foram cultivados em ágar YPD contendo 500 μ g/mL de zeocina e posteriormente selecionados por *Colony Blot* com MAb anti-6XHis conjugado à peroxidase (1:6000). O clone

selecionado foi cultivado em biorreator de bancada utilizando meio basal de sais, temperatura de 28°C e agitação controlada pelo oxigênio dissolvido, mantido constante a 30% após o início da indução com 0,5% de metanol. Após, foi confirmada a expressão da rTES30P, por *Dot blot* e *Western blot*, porém, ao invés de ter sido secretada, a proteína foi detectada no *pellet*. Ainda, foi caracterizada por Ensaio Imonoenzimático (ELISA-IgG) usando soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. canis* e comparada com o antígeno TES nativo, apresentando 100% de especificidade e sensibilidade. A rTES30P apresenta potencial para ser usada no imunodiagnóstico da toxocaríase.

PALAVRAS-CHAVE: Toxocaríase, *Toxocara canis*, proteína recombinante, TES-30, diagnóstico.

ABSTRACT:

Human toxocariasis is an important parasitic zoonosis constituting a significant public health problem. Recombinant antigens have been evaluated as good targets for improving the effectiveness in the immunodiagnosis of toxocariasis. This study aimed to expression and characterization of the TES30 excretion and secretion protein of *Toxocara canis* in *Pichia pastoris* (rTES30P). A synthetic gene containing the codons preferred by *P. pastoris*, was cloned into the expression vector pPICZ α B. Competent cells of the KM71H (Mut^S) *P. pastoris* were transformed by electroporation with the recombinant vector (pPICZ α B/*tes30*). Recombinant clones were grown on YPD agar containing 500 ug / ml Zeocin and, subsequently, selected by *Colony Blot* with MAb anti-6xHis conjugated to peroxidase (1:6000). The selected clone was cultivated in a stand bioreactor using basal medium of salts, temperature of 28° C and agitation controlled by dissolved oxygen, maintained constant at 30% after the initiation of induction with 0.5% methanol. After, was confirmed expression of rTES30P by *Dot blot* and *Western blot*, however, rather than

having been secreted, protein was detected in the pellet. Still, was characterized by ELISA-IgG using sera of mice infected experimentally against *T. canis* and compared with the native antigen TES, recognises 100% specificity and sensitivity. rTES30P has potential to be used in immunodiagnosis of toxocariasis.

KEYWORDS: toxocariasis, *Toxocara canis*, recombinant protein, TES-30, diagnosis.

INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose difundida em todo o mundo, constituindo-se em um importante problema de saúde coletiva (Haralambidou *et al.*, 2005), porém é mais um exemplo de uma zoonose negligenciada, resultando em taxas de prevalências subestimadas (Torgerson e Budke, 2006).

Atualmente, o diagnóstico é feito por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) associado ao antígeno de excreção e secreção de *Toxocara canis* (TES). Porém, o procedimento para obtenção deste antígeno demanda aproximadamente três a quatro meses. (Sugane, 1983), sendo demasiadamente fastidioso e de baixa eficiência. Antígenos recombinantes são visados como uma alternativa frente ao problema, possibilitando o desenvolvimento de métodos diagnósticos mais fidedignos.

Alguns autores acreditam que as frações de menor massa molecular do antígeno TES apresentam maior especificidade (Magnaival *et al*, 1991) e que a proteína recombinante correspondente a 30 kDa, em ensaio de ELISA de IgG anti-*T. canis*, apresenta boa sensibilidade e especificidade (Yamasaki *et al*, 1998; 2000).

O sistema de expressão heterólogo de proteínas baseado na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem obtido importante aceitação devido à facilidade de manipulação genética de *P. pastoris*, à produção de altas concentrações de proteínas exógenas, sendo de fácil adaptação à fermentação em larga escala, favorecendo inclusive a produção em escala

industrial, bem como pela capacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais, como a glicosilação (Cereguino e Cregg, 2000).

Em vista disto, este trabalho teve por objetivo clonar, expressar e caracterizar a proteína TES30 de *T. canis* produzida em *Pichia pastoris* (rTES30P).

MATERIAL E MÉTODOS

Gene sintético

O gene sintético para o TES30, com 645 pb, foi desenhado a partir da sequência depositada no GenBank (AB009305) contendo códons preferenciais de *P. pastoris* (*codon usage*) e sítios de enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZ α B. A síntese do gene foi realizada pela empresa Epoch Biolabs® (USA), a qual entregou o gene clonado no plasmídeo pUC18.

Clonagem do gene sintético no vetor de expressão em *P. pastoris*

O gene sintético foi clonado no vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZ α B (Invitrogen), segundo Sambrook e Russel (2001). Para liberar o gene sintético (inserto) do vetor pUC18, foram utilizadas as enzimas de restrição *Eco*RI e *Kpn*I. Após eletroforese do material digerido, o inserto foi extraído do gel de agarose mediante *kit* de purificação e concentração de DNA illustra[®] GFX[®] PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK). A ligação do inserto no vetor pPICZ α B foi feita com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen). Células de *E. coli* TOP 10F (Invitrogen) competentes foram transformadas por choque térmico e os transformantes selecionados em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 25 μ g/ml de zeocina. Os clones recombinantes foram caracterizados por digestão enzimática e sequenciamento. O vetor pPICZ α B/*tes*30 linearizado com enzima de restrição *Pme*I, que corta o vetor uma única vez na região promotora (pAOX1), possibilitando a sua integração no cromossomo através de

recombinação homóloga. A transformação de *P. pastoris* cepa KM71H, fenótipo Mut^S, foi feita por eletroporação (25 μ F, 200 μ s, 2 kV) segundo protocolo descrito pela Invitrogen (EasySelectTM *Pichia* Expression Kit, Version G). Os clones recombinantes foram selecionados em agar YPDS (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% dextrose; 1M sorbitol; 2% Agar) contendo 500 μ g/mL de zeocina e, posteriormente selecionados por *Colony blot*.

Colony blot

A seleção das colônias recombinantes de *P. pastoris* com expressão positiva foi realizada através de *Colony blot* (Goodnough *et al.* 1993), com modificações. Resumidamente, os transformantes foram cultivados em meio BMMY Agar (Buffered Methanol-complex Medium 0,5%) e MM Agar (Minimal Methanol 2%), sendo adicionado, no topo da placa, a cada 24 h, 2% do volume total de meio de metanol 100%. Por contato, as colônias foram transferidas para a membrana de nitrocelulose HybondTM ECL, por 3 h a 28 °C, a qual foi bloqueada com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T). Para a detecção foi utilizado MAb Anti-6xHIS HRP (Invitrogen). A reação foi revelada com DAB (0.6 mg de 3,3'-Diaminobenzidina, 0.03% de sulfato de níquel, 50 mM Tri-HCl pH 8, H₂O₂ 30 vol). KM71H não transformada foi utilizada como controle negativo e a glicoproteína recombinante de envelope do Herpesvírus Bovino Tipo 5, presente somente em alphaherpesvírus, BoHV-5 - tgD, como controle positivo.

Expressão da rTES30P

Colônias com expressão positiva foram repicadas em caldo BMGY e incubadas em agitador orbital (200 rpm, 28°C) até atingirem DO₆₀₀ = 4. Nesse momento, as culturas foram centrifugadas e o *pellet* ressuspendido em BMMY contendo 0,5% de metanol. A expressão foi feita em agitador orbital por sete dias, a fim de observar o melhor tempo de secreção da proteína. A cada 24 h, 0,5% de metanol foram adicionados, visando induzir a

expressão da proteína recombinante e amostras de sobrenadante e de *pellet* foram coletadas para análise dos níveis de expressão por *Dot blot* com MAb anti-6XHis conjugado à peroxidase. O clone que demonstrou maior expressão foi utilizado na expressão em larga escala, em biorreator de bancada de 7 l. Primeiramente, o pré-inóculo foi cultivado em YPD e incubado a 28°C, sob agitação de 125 rpm, por 14-16 h.. O inóculo foi realizado em meio BMGY e incubado por 24 h a 28°C sob agitação de 125 rpm, totalizando 5-10% do volume de fermentação inicial. Após, o volume total do inóculo foi adicionado ao meio basal de sais ($\frac{1}{4}$ de sais e $\frac{1}{2}$ de glicerol), segundo Brady *et al.* (2001), com modificações. A temperatura de 28°C manteve-se constante durante o experimento e a agitação (200-1000 rpm) controlada pelo oxigênio dissolvido, mantido constante a 30% após o início da indução. O consumo de glicerol total foi observado por 2 picos de elevação nas taxas de oxigênio dissolvido e a suplementação com 50% (v/v) de glicerol foi mantida por 1 h. A indução da expressão foi realizada com 0,5% de metanol a cada 24 h, sendo realizada indução por aproximadamente 86 h. Após a indução, o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônia e, ainda, feito a lise celular do *pellet*, conforme protocolo descrito pela Invitrogen (EasySelectTM *Pichia* Expression Kit, Version G), para liberação da proteína que não foi secretada. Para verificar a expressão da proteína, foi realizado *Dot blot* das amostras de sobrenadante e da lise do *pellet* do cultivo frente MAb anti-6XHis conjugado à peroxidase (1:6000). O material proveniente da lise do *pellet* foi purificado por cromatografia de afinidade com coluna de gravidade (HisGraviTrap - GE Healthcare), conforme instruções dos fabricantes, e, após, dialisado em PBS. A proteína foi quantificada por BCATM Protein Assay (USA), conforme as instruções do fabricante, utilizando BSA como padrão e avaliada por SDS-PAGE, WB e ELISA.

Antigenicidade da proteína rTES30P por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto

Os soros dos camundongos inoculados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis* foram provenientes de soroteca do Laboratório de Parasitologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Rio Grande (FURG). Para o ELISA indireto, foram utilizados 40 soros positivos de camundongos Balb/c infectados experimentalmente com ovos embrionados de *T. canis* e confirmados pela recuperação larvária, por digestão tecidual total (Wang e Luo, 1998) e 10 soros negativos coletados antes da infecção experimental por *T. canis*. Para controle de reação inespecífica foram utilizados soros de cinco crianças positivas para enteroparasitos: *Ascaris lumbricoides* (2), *Trichuris trichiura* (2) e *Giardia lamblia* (1)

Cada placa foi sensibilizada com rTES30P, na concentração de 2 µg/ml, em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, por 3 h, a 37°C. O bloqueio foi realizado com PBS-T/leite em pó a 5%, durante 1 h a 37°C. Os soros foram testados, em duplicata, na diluição de 1:50 e o conjugado anti-IgG de camundongo (Sigma) na diluição de 1:1000, em PBS pH 7,4 contendo Tween-20 a 0,05% (PBS-T). Tanto os soros como o conjugado foram incubados durante 45 min a 37°C. Entre as distintas fases, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T, por automação. Todos os reagentes foram usados no volume de 100 µl. Como cromógeno foi utilizado o OPD em tampão fostato citrato pH 4,0, acrescido de peróxido de hidrogênio a 0,1%, sendo realizada a leitura (450 nm) 15 minutos.

Para estabelecer o ponto de corte (*cut off*) no ELISA indireto foi feita a média aritmética da absorbância dos soros negativos de camundongos acrescida de dois desvios padrão. Ainda, o *cut off* foi confirmado pela Análise de Características de Operação do Receptor (ROC) (MedCalc, Software, Mariakerke, Bélgica), onde foi determinada a especificidade e sensibilidade da proteína recombinante rTES30P em comparação ao antígeno nativo TES.

RESULTADOS

Clonagem do gene sintético

A clonagem do gene sintético *tes30* no vetor de expressão pPICZ $\dot{U}$ B foi realizada com sucesso a partir da avaliação da integridade da construção, como se pode observar na figura 1. O sequenciamento evidenciou perfeita reprodução da sequência original.

Expressão e purificação da rTES30P

Alguns dos clones recombinantes pPICZ $\dot{U}$ B/*tes30* de *P. pastoris* KM71H demonstraram expressão através do *Colony blot* (figura 2). Estes foram selecionados e cultivados em meio líquido como descrito anteriormente.

Durante a expressão da proteína rTES30P, em meio líquido em agitador orbital, não foi observada quantidade representativa de proteína, no *dot blot* frente ao MAb anti-6xHis (dados não mostrados), porém o clone mais expressivo foi selecionado e cultivado em biorreator de bancada. Ao ser analisado o sobrenadante em diferentes tempos de indução com metanol, após concentração com sulfato de amônio, não foi possível a visualização da proteína recombinante no *dot blot*. Porém, quando avaliada por SDS-PAGE 12%, foi possível visualizar a proteína no produto da lise do *pellet* celular, cuja confirmação foi realizada através de *Western blot* com MAb anti-6XHis conjugado à peroxidase (Figura 3). O antígeno recombinante rendeu aproximadamente 2.2 mg de rTES30P por litro de cultivo.

ELISA indireto

A rTES30P apresentou 100% de sensibilidade e especificidade no ELISA, usando o *ócut off* acrescido de 2 desvios padrões. O uso da Análise ROC possibilitou a avaliação da acurácia deste teste (IC 95%). A avaliação da relação entre sensibilidade e especificidade foi demonstrada pelo diagrama ROC (figura 4).

DISCUSSÃO

A inespecificidade da sintomatologia e a dificuldade do diagnóstico definitivo da toxocaríase estimulam a realização de estudos que visam o desenvolvimento de técnicas com maior especificidade e sensibilidade para auxiliar no diagnóstico e em inquéritos soroepidemiológicos. Estes poderão determinar a real importância desta infecção, visto que esta vem sendo apontada como uma das zoonoses parasitárias mais difundidas no mundo.

A detecção de anticorpos específicos é extremamente relevante para confirmar o diagnóstico clínico e para realizar o tratamento das diferentes formas clínicas da toxocaríase humana. Em vista disso, antígenos recombinantes estão sendo produzidos, visando uma maior acurácia no diagnóstico (Yamasaki *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2006; Wickramasinghe *et al.*, 2008; Norhaida *et al.*, 2008; Mohamad *et al.*, 2009). Há alguns anos, a levedura *P. pastoris* foi desenvolvida como sistema de expressão heteróloga, tornando-se atraente por apresentar diversas vantagens como a alta produtividade, crescimento rápido e alta densidade celular, processamento pós-traducionais semelhante ao dos mamíferos, entre outros (Cereghino e Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Demain e Vaishnav, 2009). Neste trabalho foi demonstrado pela primeira vez a expressão bem sucedida de TES30 na levedura metilotrófica *P. pastoris*, consolidando a escolha do uso desta levedura para expressão de proteínas do TES, ainda em concordância com Fong e Lau (2004) que obtiveram expressão bem sucedida do antígeno rTES120, o qual foi reconhecido apenas por soros positivos para *T. canis* e não por soros positivos em pacientes com cisticercose, filariose, malária, amebíase e toxoplasmose, embora tenha sido testadas um baixo número de amostras.

As colônias que expressaram a proteína recombinante foram detectadas pelo MAb anti-6xHis no *Colony blot*, porém foi possível observar que nem todas secretaram a mesma quantidade de rTES30P, o que pode ter acontecido devido a diferentes números de cópias

terem sido integradas nos diferentes clones (Cregg *et al.*, 2000). A expressão da proteína em agitador orbital permitiu confirmar o clone com maior intensidade de expressão, bem como a determinação dos parâmetros de indução. Porém, mesmo utilizando um gene sintético contendo os códons preferenciais de *P. pastoris*, os níveis de expressão não foram expressivos, sendo então feita a expressão em biorreator de bancada. Após a expressão da proteína em biorreator e a concentração do sobrenadante com sulfato de amônio, não foi possível visualizar a rTES30P no *dot blot*. Isso pode ter ocorrido devido ao sinal de secreção do fator- α não ter sido eficiente (Damasceno *et al.*, 2012). O vetor de expressão pPICZ α B utiliza o sinal de secreção heteróloga do fator- α de *Saccharomyces cerevisiae* para promover a secreção da proteína recombinante (Cereghino e Cregg, 2000). Apesar da maioria das proteínas recombinantes produzidas em *P. pastoris* serem secretadas, já foram relatados na literatura problemas relacionados à detecção das proteínas no sobrenadante do cultivo (Agaphonov *et al.*, 2002; Gonçalves *et al.*, 2010; Damasceno *et al.*, 2011). A secreção de proteínas recombinantes oferece benefícios, pois evita a toxicidade do acúmulo de material no meio intracelular e permite a simplificação na purificação das proteínas (Damasceno *et al.*; 2012), porém devido ao fato da proteína heteróloga ter permanecido no meio intracelular, no presente trabalho, o *pellet* celular sofreu um processo de lise para a liberação da proteína recombinante e posterior purificação por cromatografia de afinidade com coluna de gravidade.

A caracterização da proteína recombinante rTES30P, frente a soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. canis*, foi verificada em ELISA-IgG indireto, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade em relação ao TES nativo que apresenta em torno de 78% de sensibilidade e 90% de especificidade (Glickman *et al.*, 1986; Smith, 1993; CDC, 2011). O aumento da eficiência antigênica pode estar relacionado ao *folding* da proteína rTES30P, que pelo mecanismo de modificação pós-

traducional presente no sistema de expressão de *P. pastoris*, confere maior semelhança com a glicoproteína presente no antígeno TES nativo, pois permite glicosilar e dobrar proteínas recombinantes de forma semelhante as proteínas nativas (Cereghino & Cregg, 2000). A massa molecular aparente do rTES30P, observada no *Western blot*, sugere que este antígeno foi glicosilado de maneira eficaz, tendo sido reconhecido por todos os soros verdadeiramente positivos, eliminando a hipótese de falsos positivos e falsos negativos. Os resultados neste estudo com a proteína recombinante, mostram sua potencialidade para uso no imunodiagnóstico da toxocaríase, constituindo um alvo promissor para a realização de um diagnóstico mais fidedigno para a toxocaríase humana.

SUPORTE FINANCEIRO

Agradecemos ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro concedido aos autores deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agaphonov, M.O., Romanova, N.V., Trushkina, P.M., Smirnov, V.N., Ter-Avanesyan, M.D. (2002). Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. *BMC Molecular Biology* 3,15.
- Brady, C.P., Shimp, R.L., Miles, A.P., Whitmore, M., Stowers, A.W. (2001). High-Level Production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 23, 468-475.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M. (2000). Heterologous protein expression in the 1 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* 24 (1), 45-66.

- Coelho, F. A. S., Araújo A. J. U. S, Kanamura H. Y., Rubinsky-Elefant, G. and Coêlho M. D. G. (2006). Frequency of anti-*Toxocara* sp antibodies and socioñenvironmental characterization of a rural population in the city of Pindamonhangaba, SP, Brazil. *Revista Biociências (Taubaté)* 12 (3-4), 157ñ164.
- Cregg, J.M., Cereghino, L., Shi, J., Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology* 16, 23-52.
- Damasceno, L.M. Huang, C.J., Batt, C.A. (2012). Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 31-39.
- Demain, L., Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27, 297-306.
- Fong, M.Y. e Lau, Y.L.(2004). Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Parasitology Research* 92 (2), 173-6.
- Gonçalves, M., Gibertoni, A., Montassier, M., Fernandes, C., Montassier, H. (2010). Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. *Arquivos do Instituto Biológico* 77, 609-615.
- Goodnough, M.C., Hammer, B., Sugiyama, H., Johnson, E.A. (1993). Colony 17 immunoblot assay of botulinal toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2339-2342.
- Haralambidou, S., Vlachaki, E., Ioannidou, E., Milioni, V., Haralambidis, S., Klonizakis, I. (2005) Pulmonary and myocardial manifestations due to *Toxocara canis* infection. *European Journal of Internal Medicine* 16, 601-602.

Magnaaval, J.F., Fabre, R., Maurières, P., Charlet, J. P. and De Larrard, B. (1991). Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology Research* 77 (8), 697-702.

Mohamad, S., Azmi, N. C. and Noordin, R. (2009). 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), 1712-1717.

Norhaida, A., Suharni, M., Liza Sharmini, A.T., Tuda, J., Rahmah, N. (2008). rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 102 (2), 151-60.

Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning – A laboratory Manual*, 3th Ed., Cold Spring Harbor.

Sugane, K and Oshima, T. (1983). Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. *Immunology* 50 (1), 113-120.

Torgerson, P.R. and Budke, C.M.. (2006). Economic Impact of *Toxocara* spp. Cap. 19. In: C.V. Holland and H.V. Smith (eds.), *Toxocara the enigmatic parasite*. CABI Publishing: Oxfordshire, UK.

Wang, G.X. and Luo, Z.J. (1998). A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *The Journal of Helminthology* 72, 183-184.

Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R.P., Uda, K., Suzuki, T. and Agatsuma, T. (2008). Development of a highly sensitive

IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitology Research* 103, 853-858.

Yamasaki, H., Taib, R., Watanabe, Y., Mak, J.W., Zasmy, N., Araki, K., Lim, P.K.C., Kita, K. and Aoki, T. (1998). Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitology International* 47 (3), 171-181.

Yamasaki, H., Araki, K., Lim, P.K.C., Zasmy, N., Mak, J.W., Taib, R. and Aoki, T. (2000). Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (4), 1409-1413.

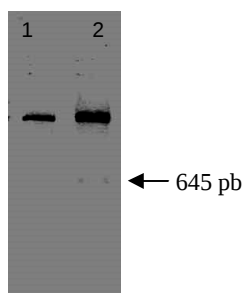


Figura 1. Gel de agarose 0,8% demonstrando a caracterização enzimática dos recombinantes. 1. pPICZ^UB/*tes30*; 2. liberação do inserto *tes30*

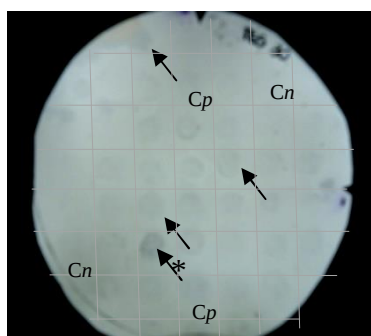


Figura 2. *Colony blot* demonstrando a expressão da proteína rTES30P. Cp - tgD de BoHV-5 (controle positivo); Cn - KM71H transformada com vetor pPICZ^UB (controle negativo). Setas indicam algumas colônias positivas expressando rTES30P. A colônia selecionada para expressão em larga escala está indicada com um asterisco (*).

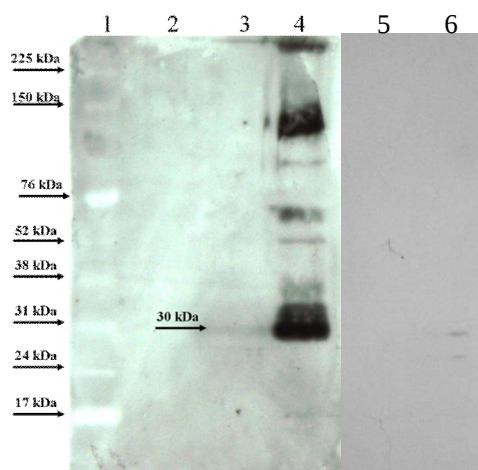


Figura 3. *Western blot* demonstrando a confirmação da expressão da proteína rTES30P frente a soro de camundongo positivo para *Toxocara canis* (1:50) e frente ao MAb anti-6xHis, revelado com Quimioluminescência. 1. marcador pré-corado Rainbow Ladder; 2. extrato de KM71H não transformada (soro); 3. rTES30P (soro) 4. TES nativo; 5. extrato de KM71H não transformada (DAB); 6. rTES30P (DAB).

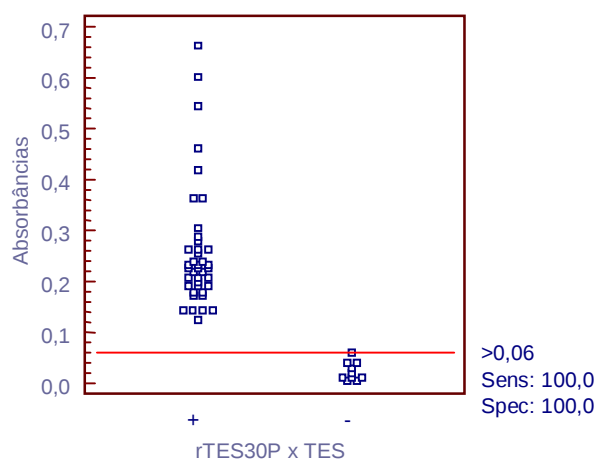


Figura 4. Análise de Características de Operação do Receptor para avaliar o antígeno recombinante rTES30P, frente a soro de camundongos experimentalmente infectados com *T. canis*, em comparação ao antígeno nativo TES.

2.4 Artigo 4

Avaliação do antígeno TES30 de *Toxocara canis* produzido em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* no imunodiagnóstico da toxocaríase humana

Paula de Lima Telmo, Neuza Maria Alcântara-Neves, Leonardo Nascimento dos Santos, Ana Lúcia Moreno Amor, Márcia Barbosa da Silva, Alana Alcântara Galvão, Emília Medeiros, Sibeles Borsuk, Carlos James Scaini, Fabricio Rochedo Conceição

Artigo segundo as regras da Revista International Journal for Parasitology ao qual será submetido.

Avaliação do antígeno TES30 de *Toxocara canis* produzido em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* no imunodiagnóstico da toxocaríase humana

Paula de Lima Telmo¹, Neuza Maria Alcântara-Neves³, Leonardo Nascimento dos Santos³, Ana Lúcia Moreno Amor³, Márcia Barbosa da Silva³, Alana Alcântara Galvão³, Emília Medeiros³, Sibele Borsuk¹, Carlos James Scaini², Fabricio Rochedo Conceição^{1*}

¹Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

²Faculdade de Medicina/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande, General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

³Instituto de Ciências da Saúde/Laboratório de Acarologia e Alergia, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon, S/N, Vale do Canela, CEP 40110-100, Salvador, SSA, Brasil

*Corresponding author: Fabricio Rochedo Conceição, E-mail: fabricio.rochedo@ufpel.edu.br - Centro de Desenvolvimento Tecnológico/Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil Tel.: 55 53 32757583; fax: 55 53 32757350.

Resumo:

A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual crônica de distribuição cosmopolita, sendo mais frequente nos países em desenvolvimento com clima tropical. Para desenvolvimento de métodos diagnósticos mais eficazes, antígenos recombinantes têm sido avaliados para diminuir as reações cruzadas frente a outras helmintoses, principalmente em países tropicais. O presente trabalho teve por objetivo avaliar as proteínas recombinantes rTES30E produzida em *Escherichia coli* e rTES30P produzida em *Pichia pastoris* no

imunodiagnóstico da toxocaríase humana. As proteínas recombinantes foram testadas por ensaio imunoenzimático (ELISA-IgG) com 307 amostras de soros humanos provenientes de soroteca do Laboratório de Acarologia e Alergia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA). A proteína rTES30E apresentou 95,8% e 82,6%, enquanto a rTES30P 95,4% e 92,8% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, quando comparadas com o TES nativo. As duas proteínas recombinantes avaliadas demonstraram potencial antigênico, contribuindo na busca de um diagnóstico com maior acurácia para a toxocaríase humana.

Palavras-chave: Toxocaríase, *Toxocara canis*, proteína recombinante, TES30, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, diagnóstico, sorologia humana.

Abstract

Human toxocariasis is a parasitic chronic tissue cosmopolitan distribution, being more common in developing countries with tropical climate. To develop more effective diagnostic methods, recombinant antigens have been evaluated to decrease the cross-reactivity against other helminths, mainly in tropical countries. This study aimed to evaluate recombinant proteins, rTES30E produced in *Escherichia coli* and rTES30P produced in *Pichia pastoris*, on immunodiagnosis of human toxocariasis. The recombinants proteins were tested by ELISA-IgG with 307 serum samples from human serum bank of Acarology and Allergy Laboratory, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA). rTES30E recognize 95.8% and 82.6%, while rTES30P 95.4% and 92.8%, sensitivity and specificity, respectively, when compared with the native TES. The two recombinants proteins evaluated demonstrated antigenic potential, contributing in the search for a more accurate diagnosis for human toxocariasis.

Keywords: toxocariasis, *Toxocara canis*, recombinant protein, TES30, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, diagnosis, human serology.

1. Introdução

A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual crônica de distribuição cosmopolita, sendo mais frequente nos países em desenvolvimento com clima tropical (CDC, 2011), porém a prevalência desta zoonose e seu impacto na saúde pública estão subestimados (Torgerson and Budke, 2006), provavelmente, devido às limitações dos métodos de diagnóstico laboratorial e pela sintomatologia inespecífica apresentada nesta infecção. Além disso, a falta de um protocolo padrão para realização do diagnóstico clínico e laboratorial dificulta o registro desta parasitose, bem como, a determinação de taxas de prevalências com maior acurácia (Smith *et al.*, 2009).

A detecção de anticorpos específicos é extremamente relevante para confirmar o diagnóstico clínico e para realizar o tratamento das diferentes formas clínicas da toxocaríase humana. Entretanto, existem controvérsias em relação à sensibilidade e especificidade destes testes sorológicos devido à carência de métodos eficazes para a detecção do parasito (método padrão-ouro) e pela dificuldade em determinar um ponto de corte (*cut off*) fidedigno na sorologia (CDC, 2011).

Diante da alta prevalência e da dificuldade de diagnosticar a doença, métodos imunológicos foram desenvolvidos, sendo o ensaio imunoenzimático (ELISA) associado ao antígeno de excreção e secreção de *T. canis* (TES) (De Savigny *et al.*, 1979; Magnaval *et al.*, 1991) o método padrão utilizado no diagnóstico para pesquisa de IgG anti-*T. canis*. Porém, a produção do TES demanda, aproximadamente, quatro meses de trabalho dispendioso e fastidioso. Além de apresentar reações cruzadas com anticorpos induzidos por antígenos de outros helmintos (Lynch *et al.*, 1988), diminuindo a especificidade do

teste, e com isso tornando necessária a adsorção prévia de soros com antígeno somático de *Ascaris* sp. (Elefant *et al.*, 2006, Souza *et al.*, 2011). Devido a isso, o desenvolvimento de métodos mais específicos é indispensável para realização do diagnóstico e tratamento precoce da toxocaríase, podendo determinar um prognóstico mais favorável à doença (Vidal *et al.*, 2003; Finsterer e Auer, 2007). Antígenos recombinantes têm sido avaliados (Yamasaki *et al.*, 2000; Wickramasinghe *et al.*, 2008; Norhaida *et al.*, 2008; Mohamad *et al.*, 2009), visando um melhor alvo para maior acurácia no diagnóstico da toxocaríase humana. De Andrade Lima Coêlho *et al.* (2005), em uma nova avaliação do mesmo antígeno, mostraram 12% de reação cruzada, salientando que o antígeno recombinante corresponde a somente uma fração do TES nativo, já que na forma nativa é constituído de múltiplos componentes de diferentes massas moleculares (Maizels *et al.*, 1984). O presente estudo teve por objetivo avaliar o antígeno TES30 produzido em diferentes sistemas de expressão, *Escherichia coli* (rTES30E) e *Pichia pastoris* (rTES30P), no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.

2. Material e Métodos

2.1. Proteínas recombinantes rTES30E e rTES30P

O gene sintético *tes30* desenhado a partir da sequência AB009305 do GeneBank foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs, Inc. (USA) contendo códons preferenciais de *P. pastoris* (*codon usage*) e sítios de enzimas de restrição para clonagem no vetor de expressão em *E. coli* pAE ou no vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZ^UB (Invitrogen). Para produção de rTES30E, após a clonagem, segundo Sambrook e Russel (2001), *E. coli* BL21 (DE3) competente foram transformadas com os vetores recombinantes por choque térmico. Um clone recombinante foi cultivado em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina até a fase log de crescimento ($DO_{600}=0,6-0,8$), em agitador orbital. A expressão foi induzida com 1 mM de isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). A

proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de Ni-Sepharose utilizando o sistema de cromatografia ÄKTAprime (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), segundo instruções do fabricante. Após, foi dialisada em Tampão Fosfato Salino (PBS) e quantificadas com o kit BCATM Protein Assay (Pierce, Rockford, IL, USA), segundo instruções do fabricante, utilizando BSA como padrão. A proteína foi avaliada por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), *Western blot* (WB) e ELISA.

Para a produção de rTES30P, após a clonagem (Sambrook e Russel, 2001) e sequenciamento, células competentes de *P. pastoris* KM71H (Mut^S) foram transformadas por eletroporação com o vetor recombinante (pPICZ^{UB}/TES30), de acordo com metodologia descrita em EasySelectTM *Pichia* Expression Kit, Version G (Invitrogen). Clones recombinantes foram cultivados em ágar YPD contendo 500 ⁻g/mL de zeocina e, posteriormente, selecionados por *Colony blot* (Goodnough *et al.* 1993) com MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase (1:6000). O clone escolhido foi cultivado em biorreator de bancada com meio basal de sais, com temperatura constante (28° C), agitação (200-1000 rpm) controlada pelo oxigênio dissolvido, mantido constante a 30% após o início da indução. A indução da expressão foi realizada com 0,5% de metanol a cada 24 h, por aproximadamente 86 h. Para verificar a expressão da proteína, foi realizado o *Dot blotting* das amostras de sobrenadante e da lise do *pellet* do cultivo frente MAb anti-his-tag conjugado à peroxidase (1:6000). O material proveniente da lise do *pellet* foi purificado por cromatografia de afinidade com coluna de gravidade (HisGraviTrap - GE Healthcare), conforme instruções do fabricante, e dialisado em PBS. A proteína foi quantificada por BCA e caracterizada por SDS-PAGE, WB e ELISA.

2.2. Antigenicidade da rTES30E e rTES30P por ELISA Indireto

Os soros humanos utilizados neste trabalho foram provenientes de soroteca do Laboratório de Acarologia e Alergia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia

(LAA/ICS/UFBA), criopreservados a -20° C. Com a intenção de reduzir as reações cruzadas, estes soros foram previamente adsorvidos com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*, na presença de PEG 12,000 (Sigma). Para a avaliação das proteínas recombinantes foi realizado ELISA indireto, utilizando os antígenos recombinantes (2 $\mu\text{g/ml}$), conjugado anti-IgG humano biotinizado e estreptavidina peroxidase (Pharmigen, Belo Horizonte, MG, Brasil) (1:6000). Os soros foram diluídos 1:50 em PBS-T/2,5% Soro Fetal Bovino (SFB), conforme protocolo utilizado no LAA/ICS/UFBA. Para calcular o *cut-off* foram utilizados soros de 10 indivíduos sem contato com cães e com eosinofilia $\geq 3\%$, onde foi calculada a média das absorbâncias acrescida de dois desvios padrão. Ainda, este ponto de corte foi confirmado como o melhor para a determinação dos resultados positivos e negativos do teste, pela Análise de Características de Operação do Receptor (ROC) (MedCalc, Software, Mariakerke, Bélgica), representando um compromisso entre a sensibilidade e o falso positivo. Também foi avaliada a área sob a curva (do inglês *Area Under Curve* ã AUC), que é numericamente equivalente a estatística de Wilcoxon.

3. Resultados

Das 307 amostras de soros humanos analisadas, o antígeno recombinante rTES30E apresentou 95,8% de sensibilidade e 82,6% de especificidade (figura 1) (IC a 95% = 0,960-0,994), enquanto o rTES30P apresentou 95,4% de sensibilidade e 92,8% de especificidade (figura 2) (IC a 95% = 0,905-0,963), frente ao TES nativo, pela análise ROC.

A curva ROC foi a análise que melhor representou a associação entre a especificidade e sensibilidade das proteínas recombinantes rTES30E e rTES30P em comparação ao antígeno TES, bem como a acurácia do teste com Intervalo de confiança (IC) de 95%.

4. Discussão

A prevalência da toxocaríase em uma determinada região pode estar diretamente relacionada à atenção dos profissionais que atuam na área da saúde para realizar o

diagnóstico desta parasitose (Smith *et al.*, 2009). Além disso, a prevalência da toxocaríase varia de acordo com a faixa etária, condições climáticas (Glickman *et al.*, 1979), com o nível sócio-econômico (Matos *et al.*, 1997), presença de cães no domicílio ou peridomicílio (Lopez *et al.*, 2005), e sensibilidade alérgica do hospedeiro (Gonzalez-Quintela *et al.*, 2006). Alguns estudos mostram que a soroprevalência de *Toxocara* spp. aumenta quanto mais baixo for o nível sócio-econômico da população (Matos *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2011).

A preocupação com esta zoonose justifica a realização de estudos sorológicos nas últimas duas décadas, em diferentes partes do mundo, empregando o ELISA-TES para pesquisa de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp., com adsorção prévia dos soros com antígeno somático de *Ascaris* sp., para reduzir reações cruzadas. Porém, para obter resultados mais específicos, antígenos recombinantes, de diferentes frações protéicas do antígeno TES, estão sendo testados, buscando um melhor alvo para ser utilizado no imunodiagnóstico. Alguns autores acreditam que há maior especificidade no uso das frações de menor massa molecular do antígeno TES proveniente de larva de *T. canis* (Magnaival *et al.*, 1991; 2002). Diversos são os sistemas existentes para a produção de proteínas recombinantes (Demain e Vaishnav, 2009). Contudo, a primeira opção para investigação laboratorial e etapas iniciais de desenvolvimento de atividades comerciais envolvendo estas proteínas é a enterobactéria Gram-negativa *E. coli* (Chen, 2011), por tratar-se de um sistema de expressão versátil, com genética bem conhecida, de fácil manipulação, de crescimento rápido e boa densidade celular e de baixo custo (Demain e Vaishnav, 2009; Chen, 2011). Neste sentido, a proteína recombinante TES30 foi expressa neste sistema e analisada em outros estudos por ELISA (Yamasaki *et al.*, 2000; De Andrade Lima Coêlho *et al.*, 2005; Norhaida *et al.*, 2008) ou por *western blot* (WB) (Yamasaki *et al.*, 1998), apresentando bons resultados, porém não apresentando 100% de eficácia antigênica.

Em vista disto, no presente estudo foram utilizadas duas proteínas recombinantes, expressas em dois sistemas diferentes de expressão, *E. coli* e *P. pastoris*, correspondente a fração protéica de 30 kDa do antígeno nativo, rTES30E e rTES30P, respectivamente, previamente caracterizadas por ELISA com soros de camundongos infectados experimentalmente com *T. canis*, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade quando comparado ao TES nativo. A positividade ou negatividade dos soros para *T. canis*, foi confirmada pela recuperação de larvas do nematoide por digestão tecidual dos órgãos e musculatura esquelética (Wang e Luo, 1998). Já no presente estudo, os antígenos recombinantes foram testados frente a soros humanos adsorvidos previamente com antígeno somático de *Ascaris lumbricoides*, reduzindo assim possíveis reações cruzadas, grande preocupação em pesquisas de diagnóstico sorológico da toxocaríase humana (Camargo *et al.*, 1992; Nunes *et al.* 1997; Moreira-Silva *et al.*, 1998). Entretanto, um teste piloto foi realizado com soros adsorvidos e não adsorvidos, não apresentando diferença significativa entre eles (resultados não mostrados).

As proteínas recombinantes produzidas apresentaram ótima eficácia antigênica, onde rTES30E apresentou 95,8% de sensibilidade e 82,6% de especificidade, enquanto o rTES30P 95,4% de sensibilidade e 92,8% de especificidade (IC 95%), quando comparados com o TES nativo. De acordo com os resultados, Yamasaki *et al.* (1998; 2000) encontraram 2,1% de reação cruzada com antígeno recombinante TES30 produzido em *E. coli* contra 43% com o TES nativo.

O antígeno recombinante rTES-30USM, produzido em *E. coli*, foi testado por ELISA-IgG₄ em comparação com um kit comercial ELISA-IgG total, conferindo maior precisão ao ensaio quanto a especificidade (Norhaida *et al.*, 2008). Esta diminuição da eficiência das proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* pode ter ocorrido por interferências de alguns fatores como a falta de processamento pós-traducional, como a falta da glicosilação

da proteína, já que a proteína nativa é glicosilada (Meghji e Maizels, 1986). Outro fator que pode ter influenciado é o fato das proteínas produzidas em *E. coli* terem sido expressas na forma de corpos de inclusão e necessitarem ser solubilizadas com uréia, levando a perda de epítomos conformacionais, podendo influenciar na imunoreatividade (Demain e Vaishnav, 2009; Chen, 2011; Maizels, 2013). Porém, discordamos desta observação, pois a proteína rTES30E, processada da mesma forma, apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, durante a caracterização com soros de camundongos experimentalmente infectados previamente.

Nenhum sistema de expressão de proteínas heterólogas é totalmente adequado devido ao fato de que cada um apresenta justificativa quanto às vantagens e desvantagens inerentes ao organismo utilizado.

O sistema de expressão baseado na levedura metilotrófica *P. pastoris* tem obtido importante aceitação e utilização crescente, devido à facilidade na manipulação genética, à habilidade de produzir altas concentrações de proteínas exógenas, à capacidade para secretá-las, à capacidade de realizar algumas modificações pós-traducionais como glicosilação, adição de pontes dissulfídicas estáveis e secreção de proteínas solúveis ao meio simplificando etapas posteriores de purificação, à disponibilidade de um sistema de expressão comercialmente acessível e ser facilmente adaptável à fermentação em larga escala (Cregg *et al.*, 1993; Cereghino e Cregg, 2000). Ainda, como é capaz de utilizar o metanol como fonte de carbono, torna-se um ótimo sistema para a produção a nível industrial, o que é justificado ainda por permitirem um rígido controle da expressão com uma simples manipulação no meio de cultura.

Embora ambas as proteínas recombinantes rTES30E e rTES30P tenham apresentado excelentes resultados no imunodiagnóstico da toxocaríase humana em comparação ao TES nativo, houve diferença significativa ($p < 0,05\%$) entre elas, onde a rTES30P mostrou

maior reatividade. Tal diferença deve ter se dado pelo fato do padrão de glicosilação e o *folding* da proteína recombinante em *P. pastoris* ser diferente da humana (Hinnen *et al.*, 1994; Tate e Grishammer, 1996; Jung e Williams, 1997), embora as modificações pós-traducionais utilizados pela *P. pastoris* sejam bastante similares as da proteína nativa (Cregg *et al.*, 1993). Também pode ter havido a influência dos antígenos de lipopolissacarídeos (LPS), que constitui a membrana celular externa das bactérias Gram-negativas. Entretanto, outra proteína de TES foi produzida em *P. pastoris* correspondente a fração protéica de 120 kDa do TES nativo, rTES-120, apresentando 100% de especificidade frente a soros de pacientes com diferentes parasitoses, ao ser avaliada por WB (Fong e Lau, 2004), apesar dos resultados necessitarem de validação devido ao baixo número de soros avaliados. O fato interessante foi a construção do clone recombinante com o vetor de expressão intracitoplasmática pPICZA, que impossibilita a glicosilação do antígeno recombinante.

Contudo, os resultados obtidos com as proteínas recombinantes no ELISA-IgG frente a soros humanos, quando comparado com o TES nativo, divergiram dos apresentados frente aos soros de camundongos infectados com *T. canis*, os quais apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade. Algumas amostras de soro foram positivas frente a as duas proteínas heterólogas, levantando a questão das proteínas recombinantes serem mais sensíveis, já que o antígeno nativo apresenta em torno de 78% de sensibilidade (Glickman *et al.*, 1986; Smith, 1993; CDC, 2011), não reconhecendo com isso aproximadamente 20% das amostras positivas. Ainda, algumas amostras positivas frente ao TES total não foram reconhecidas pelas recombinantes, podendo estar entre os falsos positivos apresentados pelo TES, pela limitação da qualidade deste antígeno, devido à variabilidade do número de larvas na cultura, tempo da cultura, morte das larvas, pureza e purificação (Nunes, 1996; Smith and Rahmah, 2006; Norhaida *et al.*, 2008). A procedência dos cães pode favorecer a

obtenção de distintas de cepas de *T. canis* e determinar diferenças entre as partidas do antígeno. Speiser and Gottstein (1984) sugeriram que as diferenças nos padrões do antígeno TES podem ocorrer devido aos cultivos de larvas serem de diferentes cepas de *T. canis*. Estes autores sugerem também que estas diferenças podem estar relacionadas aos métodos utilizados para concentração do antígeno, tais como a formação de agregados protéicos durante a ultracentrifugação ou pela retenção de proteínas nos diferentes tipos de membranas para ultrafiltração (Anicon, PM-10 e Millex). Ainda, podem ocorrer diferenças quantitativas e qualitativas entre partidas do antígeno devido à diferença no tempo de cultivo das larvas, que pode ser de vários meses (até oito). Além disso, culturas com o meio RPMI, o extrato antigênico apresenta maior concentração protéica em relação ao meio essencial mínimo de Eagle suplementado com Sal de Hanks (Badley *et al.*, 1987). Ainda a composição heterogenea do antígeno TES, possibilita pelo menos uma reação cruzada com outras parasitoses (Smith and Rahmah, 2006).

Na busca de melhores resultados para o diagnóstico da toxocaríase, três antígenos recombinantes foram produzidos, rTES26, rTES30USM e rTES120, e testados com IgG₄ específica. Apesar de separadamente não apresentarem 100% de especificidade, quando combinados, foram sensíveis a todas as amostras positivas ao TES nativo, apresentando somente de 2-4% de reações cruzadas com outras infecções (Mohamad *et al.*, 2009). Talvez, a combinação de mais de um antígeno recombinante seja uma estratégia na busca de melhores alvos para realização de um diagnóstico confiável para a toxocaríase humana. Em vista disso, novos estudos são necessários para melhorar a acurácia do diagnóstico, apesar das proteínas recombinantes terem apresentado resultados promissores frente à toxocaríase humana.

5. Agradecimentos

Agradecemos a Prof^a. Dra. Neuza Maria Alcântara-Aguiar, juntamente com sua equipe, pelo laboratório disponibilizado, soros cedidos e auxílio prestado.

Agradecemos ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro concedido aos autores deste trabalho.

6. Referências

Alonso, J.M., Bojanich, M.V.I., Chamorro, M., Gorodner, J.O. 2000. Toxocara seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. *Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo*, 42 (4), 235-237.

Badley, J.E., Grieve, R.B., Bowman, D.D., Glickman, L.T., Rockey, J.H. 1987. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. *J. Parasitol.*, 73 (3), 593-600.

CDC - Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. 2011.

Cereghino, J.L., Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (1), 45-66.

Chen, J., Zhou, D.H., Nisbet, A.J., Xu, M.J., Huang, S.Y., Li, M.W., Wang, C.R., Zhu, X.Q. 2012. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect. Genet. Evol.* 12 (7), 1344-1348.

Cregg J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. (New York)* 11 (8), 905-910.

De Savigny D.H., Voller A., Woodruff A.W. 1979 Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J. Clin. Pathol.* 32, 284-288.

Demain, L., Vaishnav, P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27, 297-306.

Elefant G.R., Shimizu S.H., Sanchez M.C., Jacob C.M., Ferreira A.W. 2006. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Lab. Analysis.* 20 (4), 164-172.

Finsterer, J., Auer, H. 2007. Neurotoxocarosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 49 (50), 279-287.

Fong, M.Y. e Lau, Y.L. 2004. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* 92 (2), 173-6.

Glickman, L.T., Schantz, P.M., Grieve, R.B. 1986. Immunodiagnosis of parasitic diseases: helminthic diseases. In: Walls, K.W., Schantz, P.M., eds. *Toxocariasis*. New York: E.U.A. Academic Press Inc., 201-31.

Glickman, L.T., Schantz, P.M., Cypess, R.H. 1979. Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 254-258.

Gonzalez-Quintela, A., Gude, F., Campos, J., Garea, M.T., Romero, P.A., Rey, J., Meijide, L.M., Fernandez-Merino, M.C., Vidal, C. 2006. *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *Intern. Arch. Allergy Immunol.*, 139 (4) 317-324.

Goodnough, M.C., Hammer, B., Sugiyama, H., Johnson, E.A. 1993. Colony immunoblot assay of botulinal toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2339-2342.

- Hinnen, A., Buxton, F., Chaudhuri, B., Heim, J., Hottiger, T., Meyhack, B., Pohlig, G. 1994. In: Smith, A. (Ed.). *Gene Expression in Recombinant Microorganisms*. Marcel Dekker: New York, EUA. pp. 121-193.
- Jung, E., Williams, K.L. 1997. The production of recombinant glycoprotein with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 25, 3-8.
- Lopez, M.A., Martin, G., Chamorro, M.C., Alonso, J.M. 2005. Toxocariosis em niños de uma region subtropical. *Medicina.* 65, 226-230.
- Lynch, N., Wilke, S.L., Hodgen, A.N., Turner, K. 1988. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Paras. Immunol.* 10, 323-337.
- Maizels, R. M. 2013. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet. Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>. Article in Press.
- Magnaaval, J.F., Fabre, R., Maurières, P., Charlet, J. P. e De Larrard, B. 1991. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Res.* 77 (8), 697-702.
- Magnaaval, J.F., Malard, L., Morassin, B., Fabre, R. 2002. Immuno-diagnosis of ocular toxocariasis using Western-blot for the detection of specific anti-*Toxocara* IgG and CAP for the measurement of specific anti-*Toxocara* IgE. *J. Helminthol.* 76, 335-339.
- Meghji, M., Maizels, R.M. 1986. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitolol.* 18, 155-170.

Mohamad, S., Azmi, N. C. and Noordin, R. 2009. 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). *J. Clin. Microbiol.* 47 (6), 1712-1717.

Norhaida, A., Suharni, M., Liza Sharmini, A.T., Tuda, J., Rahmah, N. 2008. rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 102 (2), 151-60.

Noordin, R., Smith, H.V., Mohamad, S., Maizels, R.M., Fong, M.Y. 2005. Comparison of IgG ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop.* 93 (1), 57-62.

Nunes, C.M. Imunodiagnóstico da larva migrans visceral através de um método de ELISA indireto competitivo. São Paulo, 1996. 62p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1996.

Page, A.P., Hamilton, A.J., Maizels, R.M. 1992. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. *Exp. Parasitol.* 75, 56-71.

Sambrook, J. and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning - A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.

Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J.-F., Schantz, P, Maizels, R. 2009. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* 25 (4), 182-188.

Smith, H., Rahmah, N. 2006. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In: *Toxocara: The Enigmatic Parasite*. Holland, C.V., Smith, H.V. (eds). (Wallingford, UK: CABI) pp. 93-102.

Souza, R.F., Dattoli, V.C.C., Mendonça, L.R., Jesus, J.R., Baqueiro, T., Santana, C.C., Santos, N.M., Barrouin-Melo, S.M. e Alcântara-Neves, N.M. 2011. Prevalence and risk factors of human infection by *Toxocara canis* in Salvador, State of Bahia, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44 (4), 516-519.

Speiser, F., Gottstein, B. 1984. A Collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop.* 41, 361-372.

Tate, C.G, Grisshammer, R. 1996. Heterologous expression of G protein-coupled receptors. *Trends Biotechnol.* 14, 426-430.

Torgerson, P.R., Budke, C.M. 2006. *Economic Impact of Toxocara spp.* In: Holland CV and Smith HV (eds) *Toxocara the enigmatic parasite*. (UK: CABI Publishing) Cap 19.

Vidal, J.E., Sztajnbock, J., Seguro, A.C. 2003. Eosinophilic meningoencephalites due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 69, 341-343.

Wang, G.X., Luo, Z.J. 1998. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. *J. Helminthol.* 72, 183-184.

Wickramasinghe, S., Yatawara, L., Nagataki, M., Takamoto, M., Watanabe, Y., Rajapakse, R.P., Uda, K., Suzuki, T. and Agatsuma, T. 2008. Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. *Parasitol. Res.* 103, 853-858.

Yamasaki, H., Taib, R., Watanabe, Y., Mak, J.W., Zasmy, N., Araki, K., Lim, P.K.C., Kita, K. and Aoki, T. 1998. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Int.* 47 (3), 171-181.

Yamasaki, H., Araki, K., Lim, P.K.C., Zasmy, N., Mak, J.W., Taib, R. and Aoki, T. 2000. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J. Clin. Microbiol.* 38 (4), 1409-1413.

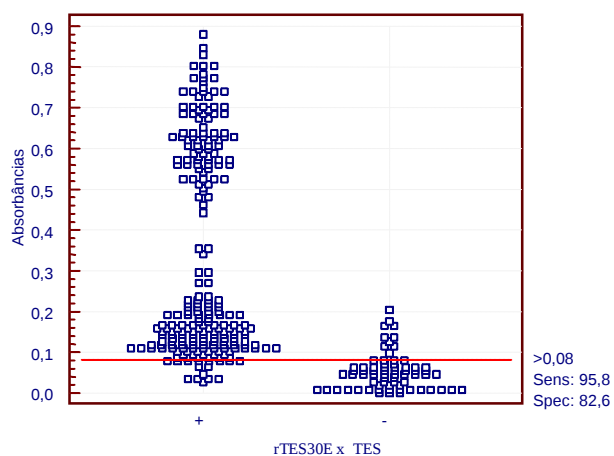


Figura 1. Diagrama de Características de Operação do Receptor mostrando a acurácia do antígeno recombinante rTES30E no teste diagnóstico com soros humanos (n=307) quando comparado com o antígeno nativo TES.

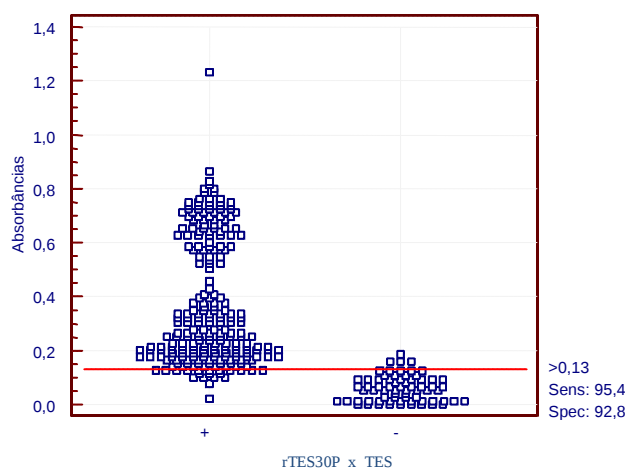


Figura 2. Diagrama de Características de Operação do Receptor mostrando a acurácia do antígeno recombinante rTES30P no teste diagnóstico com soros humanos (n=307) quando comparados com o antígeno nativo TES.

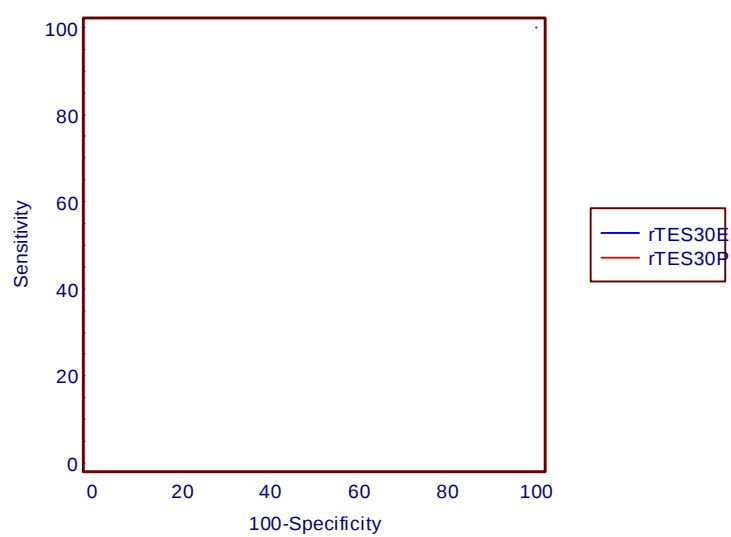


Figura 3. Curva de Características de Operação do Receptor (ROC) da comparação entre os dois antígenos recombinante rTES30E e rTES30P no teste diagnóstico para toxocaríase humana em relação ao antígeno nativo TES.

Conclusões

A proteína TES-30 foi expressa, com viabilidade, nos dois sistemas de expressão de proteínas heterólogos propostos, *E. coli* e *P. pastoris*, apresentando rendimento satisfatório com eficiente produtividade. As proteínas rTES30E e rTES30P apresentaram ótima eficácia antigênica, apresentando resultados promissores no imunodiagnóstico da toxocaríase humana.

Referências

- ABO-SHEHADA, M. N.; HERBERT, I. V. Anthelmintic effect of levamisole, ivermectin, albendazole and fenbendazole on larval *Toxocara canis* infection in mice. **Research in Veterinary Science**, v. 36, n. 1, p. 87-91, 1984.
- AGAPHONOV, M. O.; ROMANOVA, N. V.; TRUSHKINA, P. M.; SMIRNOV, V. N.; TER-AVANESYAN, M. D. Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. **BMC Molecular Biology**, v. 3, p. 15, 2002.
- AKAO, N.; OHTA, N. Toxocariasis in Japan. **Parasitology International**, v. 56, p. 87-93, 2007.
- ALCÂNTARA-NEVES, N. M.; SANTOS, A. B.; MENDONÇA, L. R.; FIGUEIREDO, C. A. V.; PONTES-DE-CARVALHO, L. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 349-351, 2008.
- ALDERETE, J. M. S.; JACOB, C. M. A.; PASTORINO, A. C.; ELEFANT, G. R.; CASTRO, A. P. M.; FOMIN, A. B. F.; CHIEFFI, P. P. Prevalence of *Toxocara* infection in Schoolchildren from the Butantã Region, São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 593-597, 2003.
- ALONSO, J. M.; BOJANICH, M. V. I.; CHAMORRO, M.; GORODNER, J. O. *Toxocara* seroprevalence in children from a subtropical city in Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 4, p. 235-237, 2000.
- AMARAL, H. L.; RASSIER, G. L.; PEPE, M.; GALLINA, T.; VILELLA, M.; NOBRE, M.; SCAINI, C. J.; BERNE, M. E. A. Presence of *Toxocara canis* eggs on the hair of dogs: a risk factor for Visceral Larva Migrans. **Veterinary Parasitology**, v. 174, p. 115-118, 2010.
- AVILA, L. F. C.; CONCEIÇÃO, F. R.; TELMO, P. L.; DUTRA, G. F.; SANTOS, D. G.; MARTINS, L. H. R.; BERNE, M. E. A.; DA SILVA, P. A.; SCAINI, C. J. *Saccharomyces boulardii* reduces infection intensity of mice with toxocariasis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 337-340, 2012.

- BADLEY, J. E.; GRIEVE, R. B.; BOWMAN, D. D.; GLICKMAN, L. T.; ROCKEY, J. H. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. **Journal of Parasitology**, v. 73, n. 3, p. 593-600, 1987.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 411-21, 1999.
- BARRIGA, O. O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis of immunological control. **Veterinary Parasitology**, v. 29, n. 2-3, p. 195-234, 1988.
- BASUALDO, J.; SPARO, M.; CHIODO, P.; CIARMELA, M.; MINVIELLE, M. Oral treatment with a potential probiotic (*Enterococcus faecalis* CECT 7121) appears to reduce the parasite burden of mice infected with *Toxocara canis*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 101, n. 6, p. 559-562, 2007.
- BAUTISTA-GARFIAS, C. R.; IXTA-RODRÍGUEZ, O.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, F.; LÓPEZ, M. G.; AGUILAR FIGUEROA, B. R. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organism administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis*. **Parasite**, v. 8, p. 226-228, 2011.
- BORCHERT, D.; SHERIDAN, L.; PAPATSORIS, A.; FARUQUZ, Z.; BARUA J. M.; JUNAID, I.; PATI, Y.; CHINEGWUNDOH, F.; BUCHHOLZ, N. Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: review and research perspective. **Indian Journal of Urology**, v. 24, n. 2, p. 139-144, 2008.
- BRADY, C. P.; SHIMP, R. L.; MILES, A. P.; WHITMORE, M.; STOWERS, A. W. High-Level Production and purification of P30P2MSP119, an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 23, p. 468-475,
- CARVALHO, E. A. A.; ROCHA, R. L. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 87, n. 2, p. 100-110, 2011.
- CDC - Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. 2013. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Toxocariasis.htm>. Accessed em: 13 junho, 2011.

- CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Review**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CHEN, J.; ZHOU, D. H.; NISBET, A. J.; XU, M. J.; HUANG, S. Y.; LI, M. W.; WANG, C.R.; ZHU, X.Q. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1344-1348, 2012.
- CHIODO, P. G.; SPARO, M. D.; PEZZANI, B. C.; MINVIELLE, M. C.; BASUALDO, J. A. In vitro and in vivo effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 615-620, 2010.
- CHOI, D.; LIM, J. H.; CHOI, D. C.; PAIK, S. W.; KIM, S. H.; HUH, S. Toxocariasis and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 46, n. 3, p. 139-143, 2008.
- CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Cytokines in asthma. **Thorax**, v. 54, p. 825-857, 1999.
- COELHO, F. A. S.; ARAÚJO, A. J. U. S.; KANAMURA, H. Y.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; COELHO, M. D. G. Frequency of anti-*Toxocara* sp antibodies and socioenvironmental characterization of a rural population in the city of Pindamonhangaba, SP, Brazil. **Revista de Biociência** (Taubaté), v. 12, n. 3-4, p. 157-164, 2006.
- CORCHERO, J. L.; VIAPLANA, E.; BENITO, A.; VILLAVARDE, A. The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of beta-galactosidase fusion proteins in *E. coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 48, p. 191-200, 1996.
- COUDEYRAS, S.; JUGIE, G.; VERMERIE, M.; FORESTIER, C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells interaction with vaginosis-associated pathogens. **Infectious Disease in Obstetrics Gynecology**, p. 1-5, 2008 epub 2009.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, p. 23-52, 2000.
- CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology** (New York), v. 11, n. 8, p. 905-910, 1993.

DAMASCENO, L. M.; HUANG, C. J.; BATT, C. A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 31-39, 2012.

DE ANDRADE LIMA COÊLHO, R.; DE CARVALHO J. R., L. B.; PEREZ, E. P.; ARAKI, K.; TAKEUCHI, T.; ITO, A.; AOKI, T.; YAMASAKI, H. Prevalence of toxocariasis in northeastern Brazil based on serology using recombinant *Toxocara canis* antigen. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 103ñ107, 2005.

DELGADO, O.; BOTTO, C.; MATTEI, R.; ESCALANTE, A. Effect of albendazole in experimental toxocariasis of mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 83, n. 6, p. 621-624, 1989.

DE SAVIGNY, D. H.; VOLLER, A.; WOODRUFF, A. W. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 32, p. 284-288, 1979.

DE SAVIGNY, D. H.; TIZARD, I. R. Toxocaral Larva Migrans: The use of Larval Secretory Antigens in Hemagglutination and Soluble Anigens Fluorescent Antibody tests. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 501-507, 1977.

DE SAVIGNY, D. H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **Journal of Parasitology**, v. 61, p. 781-782, 1975.

DEMAIN, L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, n. 2, p. 265-272, 2003.

ELEFANT, G. R.; JACOB, C. M. A.; KANASHIRO, E. H. Y.; PERES, B. A. **Toxocaríase**. In: Diagnóstico Imunológico 2ed (Brazil: Guanabara Koogan). 2001, p 323-332.

ELEFANT, G. R.; SHIMIZU, S. H.; SANCHEZ, M. C.; JACOB, C. M.; FERREIRA, A. W. A serological follow-up of toxocariasis patients after chemotherapy based on the detection of IgG, IgA and IgE antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, n. 4, p. 164-172, 2006.

ELMER, G. W.; MCFARLAND, L. V. Biotherapeutic agents in the treatment of infectious diarrhea. **Gastroenterology Clinics North America**, v. 30, p. 837-854, 2001.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization (FAO)/World Health Organization (WHO), Joint FAO/WHO Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001

<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>

Accessed em, 11 jun 2012.

FINSTERER, J.; AUER, H. Neurotoxocarosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 50, p. 279-287, 2007.

FOK, E.; KASSAI, T. *Toxocara canis* infection in the paratênico host: a study on the chemosusceptibility of the somatic larvae in mice. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 2-4, p. 243-259, 1998.

FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Recombinant expression of the larval excretory-secretory antigen TES-120 of *Toxocara canis* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 173-176, 2004.

GEMS, D.; MAIZELS, R. M. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 93, n. 4, p. 1665-1670, 1996.

GLICKMAN, L. T.; MAGNAVAL, J. F. Zoonotic roundworm infections. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 7, n. 3, p. 717-32, 1993.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiologic Review**, n. 3, p. 230-250, 1981.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M.; CYPESS, R. H. Epidemiological characteristics and clinical findings in patients with serologically proven toxocariasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 254-258, 1979.

GLICKMAN, L. T.; SCHANTZ, P. M.; GRIEVE, R. B. **Immunodiagnosis of parasitic diseases: helminthic diseases**. In: WALLS, K.W.; SCHANTZ, P.M., eds. Toxocariasis. New York: E.U.A. Academic Press Inc., p. 201-31, 1986.

GONÇALVES, M.; GIBERTONI, A.; MONTASSIER, M.; FERNANDES, C.; MONTASSIER, H. Clonagem e expressão do gene da glicoproteína S1 do vírus da bronquite infecciosa das galinhas em *Pichia pastoris*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 609-615, 2010.

GONZALEZ-QUINTELA, A.; GUDE, F.; CAMPOS, J.; GAREA, M. T.; ROMERO, P. A.; REY, J.; MEIJIDE, L. M.; FERNANDEZ-MERINO, M. C.; VIDAL, C. *Toxocara* infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 139, n. 4, p. 317-324, 2006.

GOODNOUGH, M. C.; HAMMER, B.; SUGIYAMA, H.; JOHNSON, E. A. Colony immunoblot assay of botulinal toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2339-2342, 1993.

GUARDIS, M. D. V.; RADMAN, N. E.; BURGOS, L.; FONROUGE, R. D.; ARCHELLI, S. M. *Toxocara canis*: migración larval y eosinofilia en el hospedador paraténico. **Parasitología Latinoamericana**, v. 57, p. 46 ñ 49, 2002.

GUITARD, J.; MENOTTI, J.; DESVEAUX, A.; ALIMARDANI, P.; PORCHER, R.; DEROUIN, F.; KAPEL, N. Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. **Parasitology Research**, v. 99, n. 5, p. 522-527, 2006.

GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGH, M.; TESTONI, P. A. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Digestive Disease and Sciences**, v. 45, p. 1462-1464, 2000.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Tibtech**, v. 16, p. 54-60, 1998.

HARALAMBIDOU, S.; VLACHAKI, E.; IOANNIDOU, E.; MILIONI, V.; HARALAMBIDIS, S.; KLONIZAKIS, I. Pulmonary and myocardial manifestations due to *Toxocara canis* infection. **European Journal of Internal Medicine**, v. 16, p. 601-602, 2005.

HINNEN, A.; BUXTON, F.; CHAUDHURI, B.; HEIM, J.; HOTTIGER, T.; MEYHACK, B.; POHLIG, G. In: SMITH, A. (Ed.). **Gene Expression in Recombinant Microorganisms**. Marcel Dekker: New York, EUA, pp. 121-193, 1994.

- HOFFMEISTER, B.; GLAESER, S.; FLICK, H.; PORNSCHLEGEL, S.; SUTTORP, N.; BERGMANN, F. Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 3, p. 600-602, 2007.
- HORIUCHI, A.; SATOU, T.; AKAO, N.; KOIKE, K.; FUJITA, K.; NIKAIIDO, T. The effect of free and polyethyleneglycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. **Veterinary Parasitology**, v. 129, n. 1-2, p. 83-87, 2005.
- HOTEZ, P. J.; WILKINS, P. P. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 3, n. 3, p. e400, 2009.
- HRLKOVA, G.; VELEBNÝ, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **Journal of Helminthology**, v. 75, n. 2, p. 141-146, 2001.
- HUMEN, M. A.; DE ANTONI, G. L.; BENYACOU, J.; COSTAS, M. E.; CARDOZO, M. I.; KOZUBSKY, L.; SAUDAN, K.; BOENZLI-BRUAND, A.; BLUM, S.; SCHIFFRIN, E. J.; PÉREZ, P. F. *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* in Vivo. **Infection and Immunity**, v. 73 n. 2, p. 1265-1269, 2005.
- ISHIDA, M. M.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A. W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A. J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v. 89, p. 73-84, 2003.
- JETT, B. D.; HUYNCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.
- JIN, Z.; AKAO, N.; OHTA, N. Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with *Toxocara canis*. **Parasitology International**, v. 57, p. 495-498, 2008.
- JUNG, E.; WILLIAMS, K. L. The production of recombinant glycoprotein with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 25, p. 3-8, 1997.

- LEONARDI, D.; ECHENIQUE, C.; LAMAS, M. C.; SALOMON, C. J. High efficacy of albendazole-PEG 6000 in the treatment of *Toxocara canis* larva migrans infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 375-378, 2009.
- LOPEZ, M. A.; MARTIN, G.; CHAMORRO, M. C.; ALONSO, J. M. Toxocariosis em niños de uma region subtropical. **Medicina**, v. 65, p. 226-230, 2005.
- LYNCH, N.; WILKE, S. L.; HODGEN, A. N.; TURNER, K. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. **Parasite Immunology**, v. 10, p. 323-337, 1988.
- MAFFRAND, R.; AVILA-VAZQUEZ, M.; PRINCICH, D.; ALASIA, P. Congenital ocular toxocariasis in a premature neonate. **Anales de Pediatría (Barcelona)**, v. 64, n. 6, p. 595-604, 2006.
- MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T. **Management and treatment options for human toxocariasis**. In C.V. Holland and H.V. Smith (eds) *Toxocara the enigmatic parasite* (United Kingdom: CABI Publishing), 2006.
- MAGNAVAL, J. F.; GLICKMAN, L. T. Zoonotic roundworm infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 7, n. 3, p. 717-732, 1993.
- MAGNAVAL, J. F.; FABRE, R.; MAURIÈRES, P.; CHARLET, J. P.; DE LARRARD, B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology Research**, v. 77, n. 8, p. 697-702, 1991.
- MAGNAVAL, J. F.; MALARD, L.; MORASSIN, B.; FABRE, R. Immuno-diagnosis of ocular toxocariasis using Western-blot for the detection of specific anti-*Toxocara* IgG and CAP for the measurement of specific anti-*Toxocara* IgE. **Journal of Helminthology**, v. 76, p. 335-339, 2002.
- MAIZELS, R. M. 2013. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. **Veterinary Parasitology** <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.032>. Article in Press, 2013.
- MALHEIRO, A.; ANÍBAL, F. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PERINI, A.; MARTINS, M. A.; MEDEIROS, A. I.; TURATO, W. M.; ACENCIO, M. P.; BRANDÃO, I. T.; NOMIZO, A.; SILVA, C. L.; FACCIOLI, L. H. pcDNA-IL-12 vaccination blocks eosinophilic inflammation but not airway hyperresponsiveness following murine *Toxocara canis* infection. **Vaccine**, v. 26, n. 3, p. 305-315, 2008.
- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M. G.; PICCINNI, M. P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor Interleukin 12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits

the development of IL-4 producing Th cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 1199-1204, 1993.

MEGHJI, M.; MAIZELS, R. M. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 18, p. 155-170, 1986.

MENDONÇA, L. R.; VEIGA, R. V.; DATTOLI, V. C.; FIGUEIREDO, C. A.; FIACCONE, R.; SANTOS, J.; CRUZ, Á. A.; RODRIGUES, L. C.; COOPER, P. J.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; BARRETO, M. L.; ALCANTARA-NEVES, N. M. *Toxocara* seropositivity, atopy and wheezing in children living in poor neighbourhoods in urban Latin American. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 11, p. e1886, 2012.

MOHAMAD, S.; AZMI, N. C.; NOORDIN, R. 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**, v. 47, n. 6, p. 1712-1717, 2009.

MORIMATSU, Y.; AKAO, N.; AKIYOSHI, H.; KAWAZU, T.; OKABE, Y.; AIZAWA, H. A familial case of visceral larva migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid of the patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 303-306, 2006.

MOUNTFORD, A. P.; PEARLMAN, E. Interleukin-12 and the host response to parasitic helminths; the paradoxical effect on protective immunity and immunopathology. **Parasite immunology**, v. 20, p. 509-517, 1998.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Review**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

MUSA, D.; SENOCAK, G.; BORAZAN, G.; ALTAS, P.; OZGONUL, A.; SOGUT, O.; GÜLDÜR, M. E. Effects of *Nigella sativa* and albendazole alone and in combination in *Toxocara canis* infected mice. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 61, n. 9, p. 866-870, 2011.

NOORDIN, R.; SMITH, H. V.; MOHAMAD, S.; MAIZELS, R. M.; FONG, M. Y. Comparison of IgG ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 57-62, 2005.

NORHAIDA, A.; SUHARNI, M.; LIZA-SHARMINI, A. T.; TUDA, J.; RAHMAH, N. rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 151-160, 2008.

NUNES, CÁRIS MARONI **Imunodiagnóstico da larva migrans visceral através de um método de ELISA indireto competitivo**. 1996. 62p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1996.

NUNES, C. M.; TUNDISI, R. N.; GARCIA, J. F.; HEINEMANN, M. B.; OGASSAWARA, S.; RICHTZENHAIN, L. J. Crossreactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. . **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 253-256, 1997.

OTHMAN, A. A. Therapeutic battle against larval toxocariasis: Are we still far behind? **Acta Tropica**, v. 124, n. 3, p. 171-178, 2012.

PAGE, A. P.; HAMILTON, A. J.; MAIZELS, R. M. *Toxocara canis*: monoclonal antibodies to carbohydrate epitopes of secreted (TES) antigens localize to different secretion-related structures in infective larvae. **Experimental Parasitology**, v. 75, p. 56-71, 1992.

PALUDO, M. L.; FALAVIGNA, D. L. M.; ELEFANT, G. R.; GOMES, M. L.; BAGGIO, M. L. M.; AMADEI, L. B.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Frequency of *Toxocara* infection in children attended by the health public service of Maringá, South Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 343-348, 2007.

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. **Journal of Helminthology**, v. 75, p. 299-305, 2001.

PEIXOTO, P. L.; NASCIMENTO, E.; CANÇADO, G. G. L.; MIRANDA, R. R. C.; ROCHA, R. L.; ARAÚJO, R. N.; FUJIWARA, R. T. Identification of candidate antigens from adult stages of *Toxocara canis* for the serodiagnosis of human toxocariasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 200-206, 2011.

PEREZ, B. A.; ABE-JACOB, C. M. **Toxocaríase**. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (eds.) Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes (Brazil: Ed. Guanabara Koogan). 1996, p. 208-216.

PINELLI, E.; ARANZAMENDI, C. *Toxocara* infection and its Association with Allergic Manifestations. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 33-44, 1996.

QUESADA, L. F.; OSORIO, J. C.; BILBAO, M. Efecto antiparasitario de los extractos etanólicos y etéreos de *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), frente a parásitos de clase nematodos (*Toxocara cati* y *Toxocara canis*). **Infectio**, v. 13, n. 4, p. 259-267, 2009.

REITEROVÁ, K.; TOMASOVICOVÁ, O.; DUBINSKY, P. Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 7, p. 361-368, 2003.

ROLDÁN, W. H.; ESPINOZA, Y. A.; HUAPAYA, P. E.; JIMÉNEZ, S. Diagnostico de la toxocarosis humana. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 27, n. 4, p. 613-20, 2010.

RUBINSKY-ELEFANT, G.; HIRATA, C. E.; YAMAMOTO, J. H.; FERREIRA, M. U. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 3-23, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning ñ A laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, 2001.

SATOU, T.; AKAO, N.; KOIKE, K.; WATANABE, I.; FUTIJA, K.; NIKAIDO, T. A new method for identifying potential remedies for larva migrans using crude drug extracts (I), (II). **Nature Medicine**, v. 57, p. 23-27, 2003.

SATOU, T.; HORIUCHI, A.; AKAO, N.; KOIKE, K.; FUTIJA, K.; NIKAIDO, T. *Toxocara canis*: Search for a potential drug amongst ϵ -carboline alkaloids ñ in vivo and mouse studies. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 2, p. 134-139, 2005.

SCHOENARDIE, E. R.; SCAINI, C. J.; BROD, C. S.; PEPE, M. S.; VILLELA, M. M.; MCBRIDE, A. J.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. Serodiagnosis of visceral larva migrans in children of south of Brazil. **Journal of Parasitology**, 2012. [epub ahead of print]

SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **General Molecular Biology**, v. 27, p. 442-453, 2004.

- SMITH, H.; HOLLAND, C.; TAYLOR, M.; MAGNAVAL, J-F.; SCHANTZ, P.; MAIZELS, R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 4, p. 182-188, 2009.
- SMITH, H.; RAHMAH, N. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis. In: **Toxocara: The Enigmatic Parasite**. HOLLAND, C. V.; SMITH, H. V. (eds). CABI: Wallingford, UK. 2006, p. 93-102.
- SOARES, F. J. P.; RIZZO, M. C.; SOLÉ, D.; NASPITZ, C. K. Larva Migrans Visceral em Bebê Chiador. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v. 67, n. 3/4, p. 119-121, 1991.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Jornal of. Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.
- SOUZA, R. F.; DATTOLI, V. C. C.; MENDONÇA, L. R.; JESUS, J. R.; BAQUEIRO, T.; SANTANA, C. C.; SANTOS, N. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; ALCÂNTARA-NEVES, N. M. Prevalence and risk factors of human infection by *Toxocara canis* in Salvador, State of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 516-519, 2011.
- SPEISER, F.; GOTTSTEIN, B. A Collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. **Acta Tropica**, v.41, p. 361-372, 1984.
- SPIEGELBERG, H. L.; RAZ, E. DNA-based approaches to the treatment of allergies. **Current Opinion in Molecular Therapeutics**, v. 4, n. 1, p. 64-71, 2002.
- STRUBE, C.; HEUER, L.; JANACEK, E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. **Veterinary Parasitology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033>. Article in press, 2013.
- SUGANE, K.; OSHIMA, T. Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. **Immunology**, v. 50, n. 1, p. 113-120, 1983.
- TATE, C. G.; GRISSHAMMER, R. Heterologous expression of G protein-coupled receptors. **Trends in Biotechnology**, v. 14, p. 426-430, 1996.
- TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 523-533, 2003.

- TORGERSON, P. R.; BUDKE, C. M **Economic Impact of *Toxocara* spp.** In: HOLLAND, C.V.; SMITH, H.V. (eds) *Toxocara the enigmatic parasite*. (UK: CABI Publishing) Cap 19. 2006.
- TSALIK, E. L. DNA-based immunotherapy to treat atopic disease. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 95, n. 5, p. 403-410, 2005.
- VAN UDEN, J.; RAZ, E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 902-910, 1999.
- VENTURA, S. Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 11, 2005.
- VIDAL, J. E.; SZTAJNBOK, J.; SEGURO, A. C. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 3, p. 241-243, 2003.
- WANG, G. X.; LUO, Z. J. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, p. 183-184, 1998.
- 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 Tropica**, v. 106, p. 90-95, 2008.
- WICKRAMASINGHE, S.; YATAWARA, L.; NAGATAKI, M.; TAKAMOTO, M.; WATANABE, Y.; RAJAPAKSE, R. P.; UDA, K.; SUZUKI, T.; AGATSUMA, T. Development of a highly sensitive IgG-ELISA based on recombinant arginine kinase of *Toxocara canis* for serodiagnosis of visceral larva migrans in the murine model. **Parasitology Research**, v. 103, p. 853-858, 2008.
- WON HAN, S.; MORAES, J. Z.; SILVA, C. L.; CHAMMAS, R.; RODRIGUES, M. M. **DNA vaccine**. In: KHUDYAKOV, Y.E.; FIELDS, H.A.; (eds), *Artificial DNA, methods and applications* (Florida: CRC Press). 2003, p. 329-361.
- World Health Organization ñ WHO. Action to reduce human health hazards arising from animals. *WHO Chronicle*, v. 32, p. 307-310, 1978.
- YAMASAKI, H.; ARAKI, K.; LIM, P. K. C.; ZASMY, N.; MAK, J. W.; TAIB, R.; AOKI, T. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1409-1413, 2000.

YAMASAKI, H.; TAIB, R.; WATANABE, Y.; MAK, J.W.; ZASMY, N.; ARAKI, K.; LIM, P. K. C.; KITA, K.; AOKI, T. Molecular characterization of a cDNA encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Parasitology International**, v. 47, n. 3, p. 171-181, 1998.