

CULTIVO *in vitro* E OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE ADULTOS DE *Dioctophyme renale*

CAROLINE MACIEL DA COSTA¹; GABRIELA DE ALMEIDA CAPELLA²; NATÁLIA BERNE PINTO³; SOLIANE CARRA PERERA⁴; JOSAINE CRISTINA DA SILVA RAPETTI⁵; MARIA ELISABETH AIRES BERNE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – carolinemacieltcosta@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – capellavet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – soliane.cp@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – josainerappeti@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – bernemea@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A dioctofimose é a doença causada pelo nematodeo *Dioctophyme renale* que acomete principalmente o rim direito de cães adultos. O agente é transmitido com o consumo do hospedeiro intermediário (*Anelídeo oligoqueta*) ou dos hospedeiros paratênicos (peixes, sapos e rãs) parasitados com larvas de terceiro estágio (CAYE et al. 2020).

Localizações menos comuns já foram relatadas na literatura, como rim esquerdo (PERERA et al., 2017), tumor em glândula mamária inguinal (SOUZA et al., 2011), útero gravídico (VEIGA et al., 2012), subcutâneo (SILVEIRA et al., 2015) e musculatura abdominal (CAYE et al., 2018).

O diagnóstico desta enfermidade é estabelecido por urinálise, ultrassom ou por achado acidental em cirurgia e necrópsias (PEDRASSANI; NASCIMENTO, 2015), e o tratamento é realizado por nefrectomia e remoção cirúrgica dos parasitos (SOUSA et al., 2011). No entanto, esses métodos nem sempre são eficazes, pois não é possível o diagnóstico por meio da identificação dos ovos no sedimento urinário nos casos envolvendo parasitos somente do sexo masculino, fêmeas imaturas e localizações ectópicas. Além disso, os animais infectados não costumam demonstrar sinais clínicos, sendo, muitas vezes, o diagnóstico estabelecido por achados de necropsia (LIMA, 2016).

A presença deste parasito no meio urbano é uma realidade preocupante, pois além de ser descrito com frequência no sul do Brasil a significativa presença em cães constitui-se em uma zoonose, sendo necessária assim a realização de forma eficaz de diagnóstico. Sendo assim, o objetivo deste trabalho produzir antígenos de excreção e secreção de adultos de *D. renale*.

2. METODOLOGIA

Cinco parasitos adultos, dois machos e três fêmeas, foram obtidos por nefrectomia de cães anteriormente diagnosticados positivos para *D. renale* através dos exames ultrassonográfico e de urinálise. Em seguida, esses parasitos foram colocados em um frasco contendo solução salina de Hank's, pH 7, 37°C e encaminhados ao Laboratório de Parasitologia da UFPel.

Para o estabelecimento do cultivo os parasitos adultos foram lavados em solução PBS 1x e após cultivados, as fêmeas em frascos de cultivo celular de 250ml e os machos em frascos de cultivo celular de 100ml. Os cultivo foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂ em meio RPMI-1640. O meio de cultura foi

semanalmente trocado e o meio obtido, centrifugado a 2000RPM durante 10 minutos sobrenadante armazenado a -20°C com inibidor de protease 1 mM (fluoreto de fenilmetilsulfonil) para preservação.

Para a obtenção do antígeno de excreção e secreção dos nematoides adultos uma amostra de 2200 ml de um pool de sobrenadantes dos cultivos de *Diectophyme renale* foram centrifugados a 2000 RPM, durante 10 minutos. Após foram filtrados em duas etapas, primeiro em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) e depois em membrana de 10 kDa (Sigma) a 4°C durante 24 horas. O filtrado foi dialisado contra água desionizada a 4°C e depois liofilizado para obter antígeno DES, sendo armazenado a -70°C . A quantificação foi realizada utilizando o kit Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay (23255).

A determinação das frações protéicas do antígeno DES foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) na concentração de 12%, em tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 e gel de empilhamento na concentração de 5% em tampão Tris/HCl1,5M, pH 6,8.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 3 semanas de cultivo de cinco parasitos adultos (3 fêmeas e 2 machos) foi possível obter 2200ml de sobrenadante dos cultivos dos parasitos. Após a purificação dos sobrenadantes foram obtidos 12,5mL de DES com concentração protéica de $0,59\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após a corrida eletroforética e foi possível visualizar diferentes frações protéicas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDSPAGE) com pesos moleculares variando de 250 a 25kDa., conforme Figura 1.

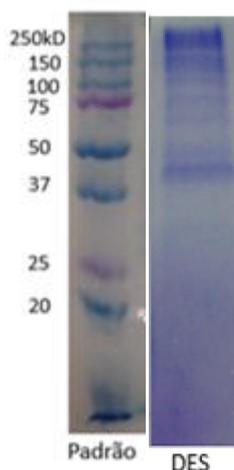


Figura 1: Eletroforese em gel a 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE) de excreção e secreção (DES) de *Diectophyme renale*.

A dioctofimose está presente na região do presente estudo, com prevalência relevante 18,6% (PERERA et al., 2016), sendo o diagnóstico sorológico ainda não utilizada. O antígeno de excreção e secreção de larvas de *Toxocara spp.* (SAVIGNY et al., 1979) é a técnica utilizado para diagnóstico de toxocaríase humana (SCHOERNARDIE et al., 2013) e em estudos epidemiológicos de toxocaríase em cães (REGIS et al., 2011).

Pedrassani et al (2017), evidenciaram por corrida eletroforética do antígeno de esôfago de *D. renale*, a presença de 15 frações proteicas pela eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), com as massas moleculares variando de 68 kDa a 10 kDa, apresentando melhor resolução no gel a 12% de poli(acrilamida) e com utilização do antígeno na concentração de 15µg por canaleta.

4. CONCLUSÕES

O estabelecimento do cultivo de adultos de *D. renale in vitro* possibilitou pela primeira vez, a produção de antígenos de excreção e secreção (DES).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAYE, P.; MILECH, V.; de LIMA, C.S. et al. Intramuscular *Dioctophyme renale* surgically removed from dog – rare case report. **Scholars Journal of Archives of Veterinary Science**, v.25, n.2, p.46-55, 2020. **Agriculture and Veterinary Science**, v.5, n.5, p.266-269, 2018.

CAYE, P.; NOVO, T. S. T.; CAVALCANTI, G. A. O.; RAPPETI, J. C. S. Prevalence of *Dioctophyme renale* (Goeze, 1782) in dogs from a Non-Governmental organization of the south of Rio Grande do Sul – Brazil. **Archives of Veterinary Science ISSN 1517-784X**. v.25, n.2, p.46-55, 2020.

LIMA, C.S.; MURAKAMI, V.; NAKASU, C.C.T.; MILECH, V.; DURANTE, L.H.; PERERA, S. C.; CLEFF, M.B.; RAPPETI, J.; CRIVELLENTI, L.Z.. *Dioctophyme renale* o verme gigante do rim: revisão de literatura. **INVESTIGAÇÃO**, v. 15, p. 37-41, 2016.

PEDRASSANI, D.; NASCIMENTO, A. A.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Improvement of an enzyme immunosorbent assay for detecting antibodies against *Dioctophyma renale*. **Veterinary Parasitology (Print)**, v. 212, p. 435-438, 2015.

PEDRASSANI, D.; NASCIMENTO, A. A. D.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. *Dioctophyme renale*: prevalence and risk factors of parasitism in dogs of São Cristóvão district, Três Barras county, Santa Catarina State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 39-46 2017.

PERERA, S. C.; CAPELLA, G. A.; PINTO, N. B.; RAPPETI, J.; MULLER, G.; BRASIL, R. H. M. A.; GIORDANI, C.; CLEFF, M. B. First isolation of *Dioctophyme renale* eggs from an urban environment and identification of those from animal urine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 26, n. 1, p. 89-9, 2016.

PERERA, S.C.; RAPPETI, J.C.S.; MILECH, V. et al. Eliminação de *Dioctophyme renale* pela urina em canino com dioctofimatose em rim esquerdo e cavidade abdominal – Primeiro relato no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p.618-622, 2017.

REGIS, S. C.; MENDONÇA, L. R.; SILVA, N. S.; DATTOLI, V. C.; ALCANTARA-NEVES, N. M. et al. (2011) Seroprevalence and risk factors for canine toxocaríasis



by detection of specific IgG as a marker of infection in dogs from Salvador, Brazil. *Acta Trop* 120: 46–51.

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

SCHOENARDIE, E. R., SCAINI, C. J., BROD, C. S., PEPE, M. S., VILLELA, M. M., MCMBRIDE, A. J., BERNE, M. E. (2013). Seroprevalence of Toxocara infection in children from south ern Brazil. **Journal of Parasitology**, 99(3), 537-539.

SILVEIRA, C.S.; DIEFENBACH, A.; MISTIERI, M.L. et al. *Diocotophyma renale* em 28 cães: aspectos clinicopatológicos e ultrassonográficos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.11, p.899-905, 2015.

SOUSA, A. R. R.; SOUSA, A.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; QUESSADA, A.M.; MENDES de FREITAS, M.V.; ORAES, R.F.N. Diocotofimose em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 3, 2011.

VEIGA, C.C.P.; OLIVEIRA, P.C.; FERREIRA, A.M.R. et al. Diocotofimose em útero gravídico em cão – relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, n.3, p.188-191, 2012.