

## USO DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR) PARA AVALIAÇÃO DE DNA DE *Toxocara canis* EM CAMUNDONGOS

ADRIANE LEITES STROTHMANN<sup>1</sup>; MICAELLE QUINTANA DE MOURA<sup>2</sup>;  
WESLEY DOUGLAS DA SILVA TERTO<sup>1</sup>; NATÁLIA BERNE PINTO<sup>1</sup>; GABRIELA  
DE ALMEIDA CAPELLA<sup>1</sup>; MARIA ELISABETH AIRES BERNE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [adri\\_ane19@hotmail.com](mailto:adri_ane19@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande – [micaele\\_m@yahoo.com.br](mailto:micaele_m@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [bernemea@gmail.com](mailto:bernemea@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase é uma zoonose de grande importância em saúde pública. Encontra-se incluída no contexto das doenças negligenciadas, sendo as principais espécies relacionadas à infecção *Toxocara canis* e *Toxocara cati* (POULSEN et al., 2015). A doença é ocasionada por infecção acidental no homem por ovos ou larvas destes nematódeos e se caracteriza pela migração das larvas L3 para diferentes tecidos do hospedeiro.

O diagnóstico atualmente é realizado através de análise dos dados clínicoepidemiológicos, associados à contagem de eosinófilos e a detecção de imunoglobulinas específicas (IgG) (WATTHANAKULPANICH, 2010). O principal desafio destes testes são as possíveis reações cruzadas com outros nematódeos, principalmente aqueles pertencentes ao gênero *Ascaris* (SAHU et al., 2013).

Devido a essa problemática, os testes moleculares têm surgido como uma opção diagnóstica. Dentre as vantagens, está a elevada sensibilidade, podendo detectar quantidades muito pequenas de DNA, e a alta especificidade, pois na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizados oligômeros específicos para o genoma do parasito em questão. Esta alta capacidade de diferenciar os agentes infectantes permitiria inclusive, a diferenciação entre as duas principais espécies causadoras da toxocaríase (ZIBAEI et al., 2017) o que hoje não é possível através de outras técnicas.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de identificação e a quantificação de DNA de larvas de *T. canis* através da técnica de qPCR no encéfalo e nos olhos de camundongos experimentalmente infectados com *T. canis*, comparando com a técnica de digestão tecidual.

### 2. METODOLOGIA

Os ovos de *T. canis* foram coletados da tuba uterina de fêmeas adultas do parasito, após foram mantidos em cultivo em solução de formalina a 2% e incubados em estufa a 28°C, por 30 dias, sob aerações diárias para haver o embrionamento. Após isso, os ovos embrionados foram submetidos a técnica de Baermann modificada (DE SAVIGNY, 1975; AVILA et al., 2013) para a recuperação das larvas.

Para a infecção foram utilizados 8 camundongos, da linhagem swiss-albina, fêmea, com seis semanas de idade. Os animais foram divididos em dois grupos

com quatro indivíduos, sendo um grupo inoculado por 1000 larvas e o outro mantido como controle negativo. O grupo controle recebeu apenas PBS (G2). A eutanásia e necropsia dos animais ocorreu 45 dias após a infecção, sendo coletados os encéfalos e olhos.

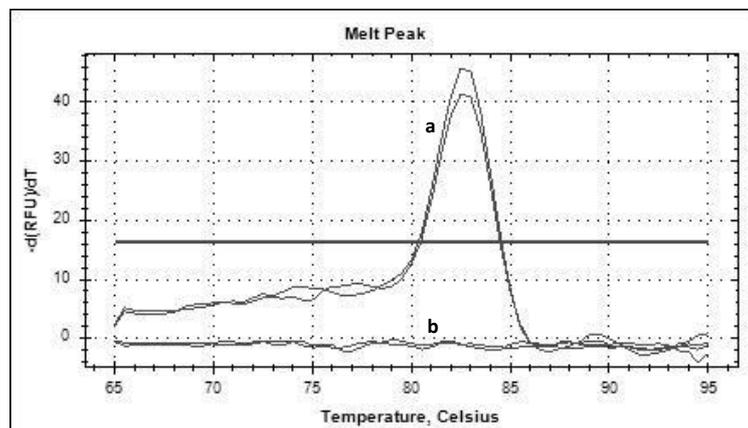
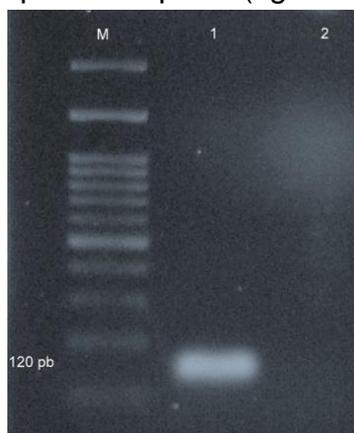
Os encéfalos foram macerados e pesados em duas replicatas de 20 mg, e o restante do órgão foi submetido a digestão tecidual para contagem de larvas (WANG & LUO, 1998). As duplicatas de 20 mg de encéfalo e os olhos foram processados para extração de DNA genômico.

As extrações de DNA foram realizadas através do kit comercial PureLink Genomic DNA Mini kit Invitrogen®, conforme as recomendações do fabricante. Cada reação de qPCR foi realizada com 100 ng de DNA, 6,25µL de SYBR Green (Invitrogen), 0,25µL de cada oligômero iniciador, 0,1 µL de ROX e água livre de DNase e RNase suficiente para ter volume final de 12µL. As temperaturas foram as seguintes: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 30s, anelamento a 50 °C por 30s, e extensão a 75°C por 30s, seguido de um ciclo de 75°C por 5 min. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Para quantificar o número de cópias de DNA foi estabelecida a curva de quantificação, para isto, foi realizado diluições seriadas na base 10 de DNA genômico de “pool” de larvas de *T. canis*. A curva foi estabelecida a partir da amostra mais concentrada com 123 ng/µL de DNA até a diluição 10<sup>-3</sup>. O número de cópias do gene alvo em cada amostra foi determinado com base no valor da curva padrão e no valor de Ct.

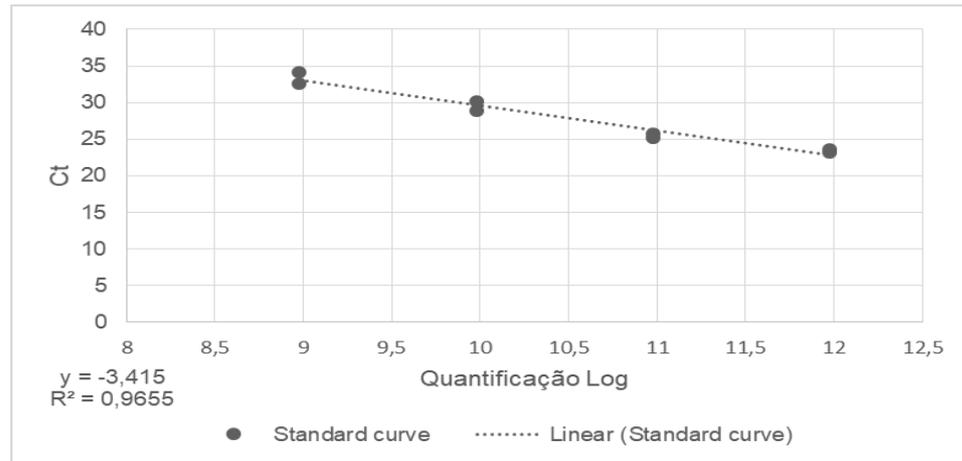
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais testados foram positivos na identificação de DNA de *T. canis* no encéfalo em pelo menos uma das duplicatas testadas, porém não foi possível a identificação de DNA do parasito por qPCR nos olhos. Não houve amplificação inespecífica com o DNA genômico dos camundongos, sendo comprovado pela ausência de amplificação no controle negativo (figura 1). A quantificação de DNA foi possível através do estabelecimento da curva de quantificação (figura 2), e utilizada para estimar o número de cópias de DNA obtidos a partir da qPCR (figura 3).

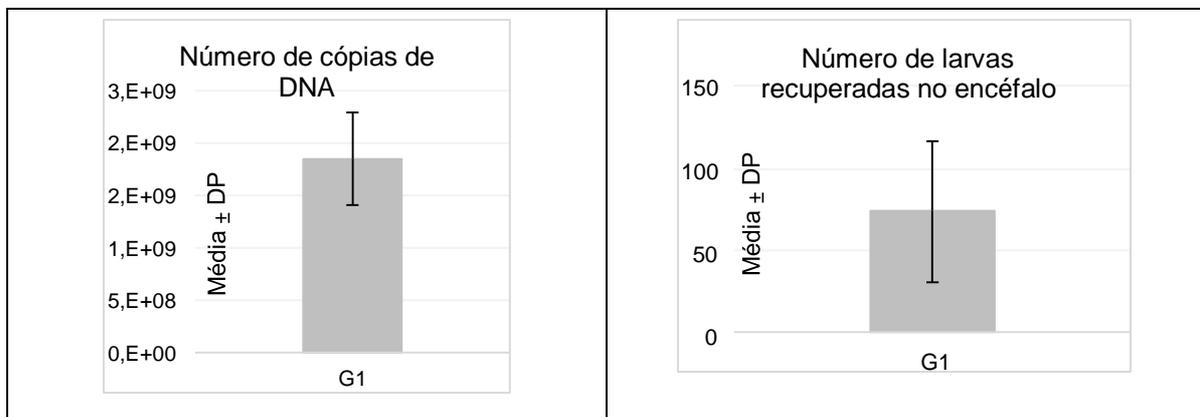


**Figura 1:** Amplificação específica do DNA de *Toxocara canis*. Da esquerda para direita: fotografia de gel de agarose a 2% demonstrando no poço 1 a amplificação do DNA de pool de larvas de *T. canis* e no poço 2 a ausência de amplificação de DNA de encéfalo de camundongo não infectado. – Representação da amplificação (a) na temperatura do ponto de fusão (meltpeak) de pool de larvas de *T. canis* a  $82,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , e ausência da formação de pico (b) em amostra de DNA de encéfalo de camundongo não infectado.

Testes parasitológicos, sorológicos e moleculares têm um grande potencial para serem utilizados como métodos não invasivos para pacientes com leishmaniose visceral, como mostra o estudo de COTA et. al (2013).



**Figura 2:** Curva padrão para quantificação de DNA de *T. canis*. A curva mostra os valores de Ct versus o log das diluições na base 10.



**Figura 3:** Amplificação de DNA demonstrado em número de cópias (barras) (imagem à esquerda) e a média de recuperação de larvas (pontos) no encéfalo (imagem à direita).

#### 4. CONCLUSÕES

A técnica de qPCR foi eficiente em identificar a infecção por *T. canis* no encéfalo de camundongos experimentalmente infectados, no entanto não foi possível por esse método identificar a presença do parasito nos olhos dos animais. Nesse estudo foi estabelecido a curva de quantificação e através desse foi realizada a quantificação da carga parasitária do número de cópias de DNA de *T. canis*. É

necessário futuramente avaliar a correlação do número de larvas recuperados com o número de cópias em animais submetidos a diferentes inóculos, afim de averiguar se por esse método seria possível estabelecer a intensidade da infecção em modelos experimentais. O diagnóstico por qPCR na identificação de *T. canis* no encéfalo de camundongos foi mais eficiente. Sendo um método promissor para diagnóstico mais rápido e preciso desta doença.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA, L.F.C. **Efeito imunomodulador de *Saccharomyces boulardii* em camundongos experimentalmente infectados por *Toxocara canis***. 2013. 71f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

COTA, G. F.; de SOUSA, M. R.; NOGUEIRA, B. M. F.; GOMES, L. I.; OLIVEIRA, E.; ASSIS, T. S. M.; MENDONÇA, A. L. P.; PINTO, B. F.; SALIBA, J. W.; RABELLO, A.. Comparison of Parasitological, Serological, and Molecular Tests for Visceral Leishmaniasis in HIV-Infected Patients: A Cross-Sectional Delayed-Type Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 89(3), p. 570–577, 2013.

DE SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple diagnosis of parasitic and fungal diseases. method for the production of *Toxocara* 200 pb 300 pb 264 pb ES antigens for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. **J Parasitol**, v. 61, p.781-2, 1975.

POULSEN, C.S.; SKOV, S.; YOSHIDA, A.; SKALLERUP, P.; MARUYAMA, H.; THAMSBORG, S.M.; NEJSUM, P. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* – is it possible? **Parasite Immunology**, n. 37, p. 204–207, 2015.

SAHU, S.; SAMANTA, S.; SUDHAKAR, N.R.; RAINA, O.K.; GUPTA, S.C.; GOSWAMI, T.K.; MADHU, D.N.; KUMAR, A. Characterization of somatic antigens of adult *Toxocara canis* by western blotting. **Vet World**, v. 6, n. 7, p. 424-427, 2013.

WANG, G. X.; LUO, Z. J. A novel method for the recovery of *Toxocara canis* in mice. **Journal of Helminthology**, v. 72, 1998.

WATTHANAKULPANICH, D. Diagnostic trends of human toxocariasis. **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 33, n.1, p. 44-52, 2010.

ZIBAEI, M.; SADJJADI, S.; MARAGHI, S. The occurrence of *Toxocara* species in naturally infected broiler chickens revealed by molecular approaches. **Journal of Helminthology**, 91 (5), p 33-636