

William Henry Roldán Gonzáles

Deglicosilação de antígenos de excreção-secreção  
de *Toxocara canis* e a sua aplicação no  
sorodiagnóstico da toxocaríase humana

Dissertação apresentada à Faculdade  
de Medicina da Universidade de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Programa de Doenças Infecciosas e  
Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Walter  
Ferreira.

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Roldán Gonzáles, William Henry

Deglicosilação de antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* e sua aplicação no sorodiagnóstico da toxocaríase humana / William Henry Roldán Gonzáles. / -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Antônio Walter Ferreira.

Descritores: 1.Toxocaríase 2.Antígenos 3.Anticorpos 4.Testes sorológicos 5.Ensaio de imunoadsorção enzimática 6.Western blotting

USP/FM/DBD-177/14

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Dedico esta dissertação a...

Aos meus pais, Enrique e Maria, meus pilares, pelo amor, pelos valores e pelo constante incentivo...

Aos meus irmãos Michael e Greyf, pelo amor e constante apoio...

À Juvissan, minha amada companheira, por estar sempre ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar e apoiar em todo momento, me dar força interior para superar as dificuldades, me mostrar o caminho nas horas incertas, me suprir em todas minhas necessidades e por ter colocado belas pessoas no meu caminho em todo este tempo.

À minha amiga e mestre, Dra. Guita Rubinsky Elefant, por sua amizade, pelo valioso apoio e incentivo em todo momento, por acreditar em mim e por ser tão fundamental neste trabalho. Obrigado por me apoiar e estimular nesta emocionante jornada.

Ao Prof. Dr. Antonio Walter Ferreira, meu orientador, que acreditou em mim desde o início até o fim do mestrado, por sua grande contribuição na realização deste trabalho. Sinto-me honrado de ter sido seu aluno.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Thelma Suely Okay pelo apoio, carinho e incentivo oferecido, em todo momento, como chefe do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

À Dra. Susana Angélica Zevallos Lescano, por sua amizade, carinho e constante incentivo. Obrigado por me apoiar nesta emocionante jornada.

À Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, por sua amizade, carinho e apoio oferecido durante todo este tempo.

Ao pessoal do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que direta ou indiretamente, me auxiliaram durante todo o longo do percurso da pós-graduação.

Às minhas amigas Thaynan Martins, Ive Maíra de Carvalho Dantas, Amanda Rodrigues de Almeida Torres, Simone Carolina Soares Petri, Lilian de Farias, Arianni Rondelli Sanchez e Camila Massae Sato. Muito obrigado por sua amizade, carinho e por compartilhar comigo muitas coisas nesta emocionante jornada.

Aos meus amigos, Marcelo Andreetta Corral e Maiara Gotardi do Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose e outras Parasitoses (LIM/06 - FMUSP), por sua amizade, carinho e constante estímulo nesta emocionante jornada.

À Sra. Roseli Antonia Santo, secretária do Programa de Pós-graduação em Doenças infecciosas e Parasitárias da FMUSP, por sua amizade, carinho e valioso auxílio no período da pós-graduação.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 Histórico da toxocaríase.....	2
1.2 Ciclo biológico de <i>Toxocara</i> spp.....	3
1.3 Formas clínicas da toxocaríase.....	6
1.3.1 Toxocaríase visceral (TV).....	7
1.3.2 Toxocaríase ocular (TO).....	7
1.3.3 Neurotoxocaríase (NT).....	8
1.3.4 Toxocaríase oculta (CT).....	8
1.4 Diagnóstico da toxocaríase.....	8
1.5 Justificativa.....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	14
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
<b>3 MÉTODOS</b> .....	16
3.1 Casuística.....	17
3.2 Produção de antígenos de excreção-secreção de larvas infectantes de <i>Toxocara canis</i> .....	17
3.3 Deglicosilação dos antígenos TES.....	18
3.3.1 Tratamento com hidróxido de sódio ( $\beta$ -eliminação).....	18
3.3.2 Tratamento com metaperiodato de sódio (oxidação dos carboidratos).....	18
3.3.3. Teste de estabilidade dos antígenos TES deglicosilados.....	19

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	19
3.4.1 Coloração do gel com nitrato de prata.....	20
3.4.2 Coloração do gel com ácido periódico de Schiff (PAS).....	20
3.5 Teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	20
3.6 Western-blotting (WB).....	21
3.7 Deglicosilação “in situ” dos antígenos TES.....	22
3.8 Análise estatística.....	22
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
4.1 Deglicosilação dos antígenos TES.....	24
4.1.1 Tratamento dos antígenos TES com hidróxido de sódio.....	25
4.1.2 Tratamento dos antígenos TES com metaperiodato de sódio.....	27
4.2 Teste ELISA.....	29
4.2.1 ELISA-IgG.....	29
4.2.2 ELISA-IgM.....	33
4.2.3 ELISA-IgE.....	37
4.3 Western-blotting (WB).....	41
4.3.1 WB-IgG.....	41
4.3.2 WB-IgM.....	44
4.3.3 WB-IgE.....	47
4.4 Deglicosilação “in situ” dos antígenos TES.....	49
4.5 Estabilidade dos antígenos TES deglicosilados.....	49
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>
Anexo nº 1.....	76
Anexo nº 2.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

<i>T. canis</i>	<i>Toxocara canis</i>
<i>T. cati</i>	<i>Toxocara cati</i>
LMV	Larva migrans visceral
TV	Toxocaríase visceral
TO	Toxocaríase ocular
TC	Toxocaríase oculta
Th1	Células T auxiliares tipo 1
Th2	Células T auxiliares tipo 2
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
<i>A. lumbricoides</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>
TES	Antígenos de excreção secreção de larvas de <i>Toxocara canis</i>
dTES	Antígenos TES deglicosilados
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgE	Imunoglobulina E
NaOH	Hidróxido de sódio
NaIO <sub>4</sub>	Metaperiodato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
HCl	Ácido clorídrico
T.A.	Temperatura ambiente
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
h	Hora
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2
PBS-T	PBS contendo Tween 20 a 0,05%
WB	Western-blotting



PAS	Ácido periódico de Schiff
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
ROC	Curvas de características de operação do receptor

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Toxocara canis</i> .	Pág. 4
Figura 2	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos de excreção e secreção de larvas de <i>Toxocara canis</i> (TES) tratados com diferentes concentrações de NaOH a 4°C por 24 horas e corados com nitrato de prata (a) ou ácido periódico de Schiff (PAS) (b). C = controle (sem tratamento). A massa molecular está expressa em kDa.	Pág. 29
Figura 3	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 37°C durante 3 horas e corados com nitrato de prata (a) ou PAS (b). C = controle (sem tratamento). A massa molecular está expressa em kDa.	Pág. 26
Figura 4	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 37°C por 24 horas e corados com nitrato de prata (a) ou PAS (b). C = controle. A massa molecular é expressa em kDa.	Pág. 26
Figura 5	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 56°C por 3 horas e corados com nitrato de prata. C = controle (sem tratamento). A massa molecular está expressa em KDa.	Pág. 27
Figura 6	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% e coloração com nitrato de prata dos antígenos TES tratados a 37°C por 4 horas com 100 mM de NaOH para obtenção de um produto deglicosilado (dTES) com uma aparente massa molecular de 26 KDa.	Pág. 28
Figura 7	Eletoforese em gel de poliacrilamida a 12% e coloração com nitrato de prata do tratamento dos antígenos TES com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (NaIO <sub>4</sub> ). C = controle. A massa molecular é expressa em KDa.	Pág. 28
Figura 8	Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) testados a uma diluição de 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.	Pág. 30
Figura 9	Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off para cada antígeno está representado pela linha pontilhada.	Pág. 31
Figura 10	Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: <i>Ascaris lumbricoides</i> (Asl = 13), <i>Trichuris trichiura</i> (Tt = 6), <i>Ancylostoma</i> spp (Anc = 4), <i>Strongyloides stercoralis</i> (Ss = 26), <i>Hymenolepis nana</i> (Hn = 14), <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (Dp = 3), cisticercose por <i>Taenia solium</i> (Ts = 6) e <i>Fasciola hepatica</i> (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.	Pág. 32

Figura 11	Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) testados a uma diluição de 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.	Pág. 34
Figura 12	Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis (n= 95) e de pacientes com toxocaríase (n= 58) diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.	Pág. 35
Figura 13	Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: <i>Ascaris lumbricoides</i> (Asl = 13), <i>Trichuris trichiura</i> (Tt = 6), <i>Ancylostoma</i> spp (Anc = 4), <i>Strongyloides stercoralis</i> (Ss = 26), <i>Hymenolepis nana</i> (Hn = 14), <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (Dp = 3), cisticercose por <i>Taenia solium</i> (Ts = 6) e <i>Fasciola hepatica</i> (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.	Pág. 36
Figura 14	Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) testados a uma diluição de 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.	Pág. 38
Figura 15	Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis (n= 95) e de pacientes com toxocaríase (n= 58) diluídos a 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. Os valores do cut-off estão representados pela linha pontilhada.	Pág. 39
Figura 16	Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: <i>Ascaris lumbricoides</i> (Asl = 13), <i>Trichuris trichiura</i> (Tt = 6), <i>Ancylostoma</i> spp (Anc = 4), <i>Strongyloides stercoralis</i> (Ss = 26), <i>Hymenolepis nana</i> (Hn = 14), <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (Dp = 3), cisticercose por <i>Taenia solium</i> (Ts = 6) e <i>Fasciola hepatica</i> (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti- <i>Toxocara</i> spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. Os valores do cut-off estão representados pela linha pontilhada.	Pág. 40
Figura 17	Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 42
Figura 18	Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 42
Figura 19	Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos TES (esquerda) e dTES (direita), em soros de pacientes infectados com <i>Ascaris lumbricoides</i> (Asl = 13), <i>Trichuris trichiura</i> (Tt = 6), <i>Ancylostoma</i> spp (Anc = 4), <i>Strongyloides stercoralis</i> (Ss = 26), <i>Hymenolepis nana</i> (Hn = 14), <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (Dp = 3), cisticercose por <i>Taenia solium</i> (Ts = 6) e <i>Fasciola hepatica</i> (Fh = 3), diluídos a 1/50.	Pág. 43

Figura 20	Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 45
Figura 21	Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 45
Figura 22	Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente os antígenos TES (esquerda) e os antígenos dTES (direita), em soros de pacientes infectados com <i>Ascaris lumbricoides</i> (n = 13), <i>Trichuris trichiura</i> (n = 6), <i>Ancylostoma</i> spp (n = 4), <i>Strongyloides stercoralis</i> (n = 26), <i>Hymenolepis nana</i> (n = 14), <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (n = 3), cisticercose por <i>Taenia solium</i> (n = 6) e <i>Fasciola hepatica</i> (n = 3), diluídos a 1/50.	Pág. 46
Figura 23	Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 47
Figura 24	Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.	Pág. 48
Figura 25	Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos TES (esquerda) e dTES (direita), em soros de pacientes infectados com outras helmintíases e que apresentaram reatividade no teste ELISA: <i>Ascaris lumbricoides</i> (Asl), <i>Strongyloides stercoralis</i> (Ss), <i>Hymenolepis nana</i> (Hn) e <i>Diphyllobothrium pacificum</i> (Dp).	Pág. 48
Figura 26	Reatividade dos anticorpos IgG pelo Western-blotting, em soros de pacientes com toxocaríase (pool de soros diluído a 1/50) contra os antígenos TES que foram tratados previamente “in situ” com metaperiodato de sódio (NaIO <sub>4</sub> ) e hidróxido de sódio (NaOH) às concentrações finais de 50 e 100mM durante 4 horas a 37°C. Utilizou-se PBS como controle do tratamento(C). As massas moleculares das principais frações dos antígenos TES estão expressas em kDa.	Pág. 59
Figura 27	Reatividade dos antígenos dTES armazenados por 4 semanas, às temperaturas de -20°C (a), 4°C (b), 22°C (c) e 37°C (d), frente a um pool de soros de pacientes com toxocaríase com alta reatividade (CP1) e mediana reatividade (CP2), um pool de soros de indivíduos saudáveis com reatividade próxima ao valor limiar (CN1) e abaixo do valor do limiar (CN2), para a detecção de anticorpos IgG pelo teste ELISA. Os ensaios foram feitos em sextuplicata e os valores nos gráficos correspondem às médias dos valores obtidos.	Pág. 51

## RESUMO

GONZÁLES, WHR. Deglicosilação de antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* e a sua aplicação no sorodiagnóstico da toxocaríase humana [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 78 p.

O sorodiagnóstico da toxocaríase humana é geralmente baseado na detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. em amostras de soro pelo teste ELISA utilizando os antígenos de excreção-secreção de larvas de *T. canis* (TES). No entanto, observa-se uma ocorrência de reatividade cruzada com outras helmintíases nas áreas endêmicas de poliparasitismo. Vários estudos têm mostrado que as glicanas presentes nos antígenos dos helmintos podem ser as responsáveis pela reatividade cruzada. Neste estudo, avaliamos o efeito da deglicosilação dos antígenos TES na sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA e Western-blotting para detecção de anticorpos IgG, IgM e IgE. Para a deglicosilação dos antígenos TES, estes foram tratados com diferentes concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) ou metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) e foram testados 58 amostras de soro de pacientes com toxocaríase visceral, 75 amostras de soros de pacientes com outras helmintíases, e 95 amostras de soro de indivíduos saudáveis. Nossos resultados mostraram que os antígenos TES foram totalmente deglicosilados com NaOH 100mM por 4 horas a 37°C (dTES), enquanto que o tratamento com NaIO<sub>4</sub> não gerou bons resultados. A sensibilidade e especificidade dos antígenos TES e dTES na detecção de anticorpos IgG pelo teste de ELISA foi de 100%, com menor reatividade cruzada (5,3%) para os antígenos dTES, se comparada com os antígenos TES (13,3%). Todos os pacientes com toxocaríase mostraram anticorpos IgG contra as cinco frações dos antígenos TES (32, 45, 55, 70 e 120 kDa) e contra a única fração de 26kDa dos antígenos dTES, com sensibilidades e especificidades de 100% para ambos os antígenos. A reatividade cruzada, observada com as frações de 70 kDa, 55 kDa e 32 kDa dos antígenos TES, foi eliminada totalmente quando utilizaram-se os antígenos dTES. A detecção de anticorpos IgM pelo teste de ELISA mostrou reatividade inespecífica nos três grupos estudados, com sensibilidades de 39,7% e 34,5% e especificidades de 95,8% e 96,8%, para os antígenos TES e dTES, respectivamente, porém com ocorrência de reatividade cruzada de 24% e 28% para ambos os antígenos. Os três grupos estudados apresentaram reatividade contra quase todas as frações dos antígenos TES e dTES. A detecção de anticorpos IgE apresentou sensibilidades de 63,79% e 62,07% e uma especificidade de 100%, e uma reatividade cruzada de 26,6% e 53,3% para ambos os antígenos. A maioria dos pacientes com toxocaríase (74,1%) mostraram anticorpos contra as frações de 32, 55 e 70 kDa, em quanto que

não houve reatividade nos pacientes com outras helmintíases ou nos indivíduos saudáveis. Estes resultados mostraram que a deglicosilação dos antígenos TES permite reduzir a ocorrência de reatividade cruzada nos pacientes com outras helmintíases, elevando o valor diagnóstico da detecção de anticorpos IgG. No entanto, este procedimento não permite melhorar a sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos IgM e não permite elevar a sensibilidade na detecção de anticorpos IgE pelo teste de ELISA. Por outro lado, os resultados discordantes na especificidade do Western-blotting para a detecção de anticorpos IgG, IgM e IgE sugerem a presença de epítomos conformacionais presentes no estado nativo dos antígenos TES que estariam implicados na reação cruzada observada no teste de ELISA.

Descritores: 1. Toxocaríase 2. Antígenos 3. Anticorpos 4. Testes sorológicos  
5. ELISA 6. Western blotting

## ABSTRACT

GONZÁLES, WHR. Deglycosylation of the excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* and their application for the serodiagnosis of human toxocariasis. [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014. 78 p.

Serodiagnosis of human toxocariasis is usually based on the detection of anti-*Toxocara* spp. IgG antibodies in serum samples by ELISA test using *T.canis* larvae excretory-secretory (TES) antigens. However, a cross-reactivity occurrence is observed in endemic areas of polyparasitism. Many studies have shown that the glycan structures, present in helminth antigens, can be the responsible for the cross-reactivity. In this study, we evaluated the deglycosylation of the TES antigens on the sensitivity and specificity of both the ELISA and Western-blotting for the detection of IgG, IgM, and IgE antibodies. For the deglycosylation of the TES antigens, they were treated with different concentrations of sodium hydroxide (NaOH) or sodium metaperiodate (NaIO<sub>4</sub>), and 58 serum samples of 58 patients with visceral toxocariasis, 75 serum samples of patients with other helminth infections, and 95 serum samples of healthy individuals. Our results show that the TES antigens were totally deglycosylated with 100 mM NaOH for 4 hours at 37°C (dTES), whereas not good results were obtained with sodium metaperiodate. The sensitivity and specificity of both TES and dTES antigens were 100% in detecting IgG antibodies by ELISA; the cross-reactivity observed with TES antigens (13.3%) was reduced (5.3%) when dTES antigens were used. All toxocariasis patients showed IgG antibodies against the five fractions of TES antigens (32, 45, 55, 70, and 120 kDa), but also with the 26-kDa single fraction of dTES antigens, with sensitivities and specificities of 100% for both antigens. The occurrence of cross-reactivity, observed mainly with the 32-, 55-, and 70 kDa fractions of the TES antigens, was totally eliminated when the dTES antigens were used. The detection of IgM antibodies by ELISA test showed unspecific reactivity in all studied groups, with sensitivities of 39.7% and 34.5%, and specificities of 95.8% and 96.8% for both antigens; the occurrence of cross-reactivity for both antigens were 24% and 28%, respectively. All studied groups have IgM antibodies against almost all fractions of TES antigens and the single fraction of dTES. The detection of IgE antibodies by ELISA test showed sensitivities of 63.8% and 62%, specificities of 100%, and occurrence of reactivity of 26.6% and 53.3% for TES and dTES antigens, respectively. The majority of the toxocariasis patients (74.1%) showed IgE antibodies against the 32-, 55-, and 70 kDa fractions of the TES antigens, whereas there was not reactivity in sera from patients with other helminth infections or healthy individuals.

These results showed that the deglycosylation of the TES antigens reduces the occurrence of cross-reactivity in patients with other helminth infections, increasing the diagnostic value for the detection of IgG antibodies. However, this procedure does not improve the sensitivity nor reduces the occurrence of cross-reactivity in the detection of IgM antibodies. Likewise, this procedure does not improve the sensitivity in the detection of IgE antibodies by the ELISA test. On the other hand, the high specificity obtained in the detection of IgG, IgM, and IgE by Western-blotting suggest that conformational epitopes of the TES antigens may also be the responsible for the cross-reactivity in the ELISA test.

Descriptors: 1. Toxocariasis 2. Antigens 3. Antibodies 4. Serological tests  
5. ELISA 6. Western blotting



# 1. INTRODUÇÃO

A toxocaríase humana é uma zoonose parasitária causada pela migração de larvas de *Toxocara canis* (*T. canis*) e *Toxocara cati* (*T. cati*), vermes comuns de cães e gatos, respectivamente. As primeiras descrições da toxocaríase foram feitas no início dos anos 1950 e atualmente é uma doença pouco estudada. No entanto, com a padronização de testes sensíveis e específicos, houve uma significativa melhora no conhecimento desta zoonose, sendo uma das helmintíases mais prevalentes no mundo (Despommier, 2003; Strube et al., 2013).

### 1.1 Histórico da toxocaríase

Em 1947, foi descrito um provável caso de toxocaríase em criança que apresentava granulomas hepáticos eosinofílicos, infiltração pulmonar e anemia (Perlingiero e Gyorgy, 1947). Três anos depois, Wilder (1950) descreveu pela primeira vez a presença de larvas de nematódeos em olhos enucleados por suspeita de retinoblastoma, enquanto que Mercer et al. (1950) e Behrer (1951) encontraram larvas de nematódeo sem biópsias hepáticas de crianças, suspeitando de *Ascaris lumbricoides*. Em 1952, Beaver et al. confirmaram pela primeira vez a presença de larvas de *Toxocara* spp. em granulomas hepáticos de três crianças com eosinofilia extrema, anemia, hepatomegalia com granulomas eosinofílicos, e pneumonia que denominaram como síndrome da “larva migrans visceral” (LMV). Depois de um detalhado estudo morfológico das larvas de *Toxocara*, Nichols (1956) reportou que as larvas dos estudos anteriores eram deste nematódeo.

Segundo Beaver (1956), a síndrome da LMV é caracterizada por intensa eosinofilia crônica, hepatomegalia com lesões granulomatosas eosinofílicas no fígado e infiltração pulmonar, causados por larvas de ascarídeos de cães e gatos, acometendo principalmente crianças. No entanto, outros agentes têm sido propostos como causadores da LMV; estas espécies incluem o *Gnathostoma spinigerum* e *Ancylostoma caninum*, sendo a migração larvária deste, mais restrita à pele, com raros casos descritos de acometimento visceral em humanos.

Sprent (1963) definiu LMV como a migração de larvas de nematódeos em humanos, incluindo todos os ancilostomídeos, porém Beaver (1969) restringiu este conceito à migração e persistência de larvas por períodos prolongados em hospedeiros não habituais ou paratênicos, excluindo-se assim outros agentes como a *Dirofilaria*, *Capillaria*, *Lagochilascaris*, entre outros, onde o homem se comporta como hospedeiro definitivo. No entanto, foram relatados casos de LMV causados por *Ascaris suum* no Japão, nas últimas duas décadas (Maruyama et al., 1996; Sakakibara et al., 2002).

Dentre as duas espécies de *Toxocara*, *T. canis* é sem dúvida o mais importante agente etiológico da LMV, devido ao grande parasitismo de cães com pouca idade, à resistência dos ovos expostos a ambientes hostis, às peculiaridades do seu ciclo biológico, ao padrão de migração larvária e sua persistência em tecidos (Schantz, 1989). Além disso, as larvas encontradas na avaliação histopatológica desses casos humanos eram de *T. canis* (Beaver et al., 1952; Dent et al., 1956; Wilder, 1950).

## 1.2 Ciclo biológico de *Toxocara* spp.

Os parasitos do gênero *Toxocara* seguem a seguinte classificação: Super-Reino: Eukaryota; Reino: Metazoa; Filo: Nematoda; Classe: Chromadorera; Ordem: Ascaridida; Superfamília: Ascaridioidea; Família: Toxocaridae; Gênero: *Toxocara* (The NCBI taxonomy database 2013). Existem mais de 20 espécies descritas na literatura, sendo *T. canis* e *T. cati* as espécies mais relacionadas à toxocaríase humana (Magnaval et al., 2001; Despommier, 2003), porém outras espécies como *T. pteropodis* e *T. vitulorum* foram descritas em hospedeiros mamíferos, com capacidade para infectar o ser humano (Prociv e Brindley, 1986; Omar e Barriga, 1991).

*T. canis* e *T. cati* são ascarídeos cujos vermes adultos residem no intestino delgado de cães e gatos, seus hospedeiros definitivos. As fêmeas adultas de *T. canis* medem entre 6 e 18 cm de comprimento, e os machos adultos medem entre 4 e 10 cm (Glickman e Schantz, 1981), porém há registros de machos medindo 13 cm e fêmeas medindo 20 cm (Warren, 1971). As fêmeas de *T. cati* medem entre 4 e 12 cm e os machos medem entre 3 e 6 cm. É possível diferenciar as espécies adultas pelas asas cefálicas, que se apresentam estreitas na extremidade anterior em *T. canis* e largas em *T. cati*.

Uma fêmea adulta grávida de *T. canis* pode liberar até 200.000 ovos por dia e, considerando que um cão possa albergar até centenas de vermes em seu intestino, a contaminação ambiental poderia chegar a milhões de ovos, levando a um grave problema de saúde pública. Os ovos liberados necessitam de um período de incubação entre 2 a 5 semanas, e de certas condições de temperatura (15 a 35°C) e umidade (superior a 85%) para tornarem-se infectantes (Glickman e Schantz, 1981).

A diferenciação dos ovos entre as duas espécies pode ser realizada através da microscopia óptica e eletrônica de varredura (Uga et al., 2000). A parede dos ovos de *T. canis* é constituída por quatro camadas: interna, quitinosa, vitelina e proteica (Hassan e el-Manawaty, 1994; Brunanská, 1997).

As larvas das duas espécies apresentam comprimento aproximado de 400 µm e diâmetro entre 12 e 20 µm (Nichols, 1956). Em relação à forma infectante, alguns autores consideram as larvas de segundo estadio (L2), enquanto outros consideram as de terceiro estadio (L3), devido às duas mudas sofridas pelas larvas (Araujo, 1972; Brunanská et al., 1995).

*T. canis* possui um complexo ciclo biológico, adaptando-se a várias situações para sobreviver e infectar outros animais. Os cães e outros canídeos adquirem a infecção por ingestão de ovos larvados, ingestão de tecidos de hospedeiros paratênicos infectados com larvas, migração transplacentária ou transmamária das larvas, e ingestão de larvas de último estadio ou vermes adultos imaturos presentes em vômito ou fezes dos filhotes infectados no momento da higienização (Glickman e Schantz, 1981) (Figura 1).

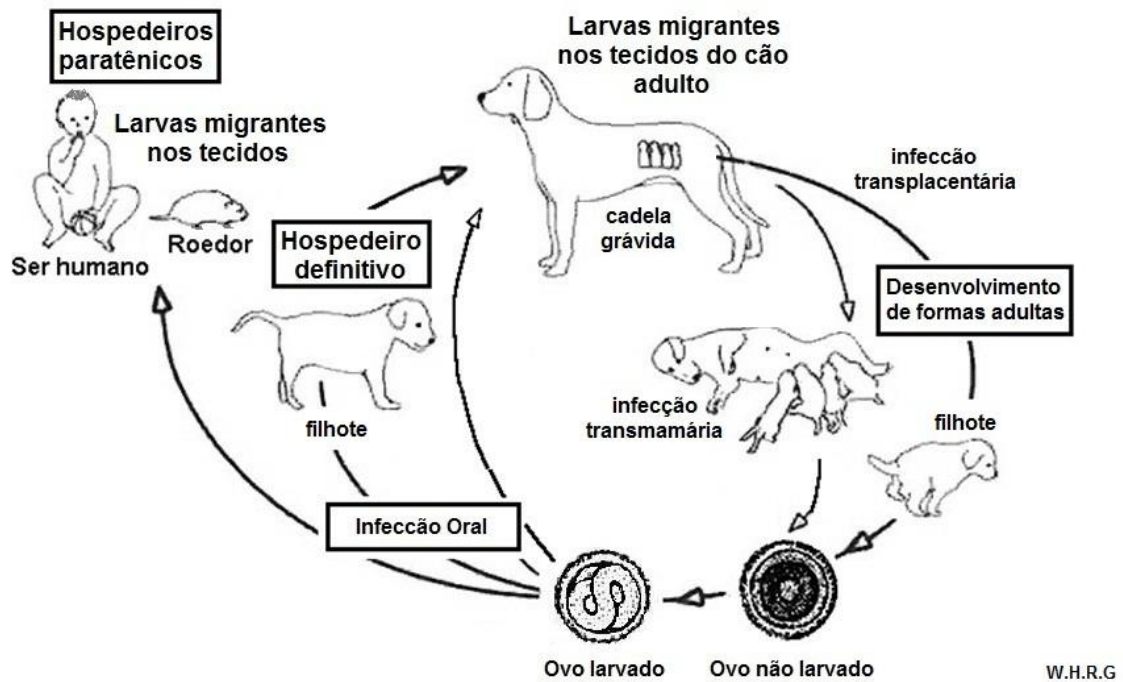


Figura 1. Ciclo biológico de *Toxocara canis*.

Só nos hospedeiros definitivos as larvas infectantes, liberadas no intestino delgado, atravessam a mucosa intestinal e alcançam os vasos sanguíneos ou linfáticos, migrando para o fígado nas primeiras 24 horas. Por meio da circulação sanguínea, as larvas passam do coração aos pulmões e logo aos bronquíolos, traqueia, faringe e finalmente são deglutidas para o sistema digestivo, completando assim seu desenvolvimento a verme adulto no intestino delgado, com eliminação de ovos entre quatro e cinco semanas pós-

infecção. No entanto, algumas larvas podem seguir a rota somática, sendo levadas pelas veias pulmonares ao coração e distribuídas pelo sistema circulatório para os diferentes tecidos do corpo, principalmente pulmões, fígado, rins e músculos (Sprent, 1958; Glickman e Schantz, 1981).

Este padrão de migração larvária pode estar relacionado à idade do hospedeiro definitivo. Em cães com menos de cinco meses, observa-se predominância da migração traqueal, onde as larvas chegam ao trato digestivo e completam o ciclo até vermes adultos. No entanto, em cães adultos, a maioria das larvas segue a rota somática migrando para os tecidos, podendo assim sobreviver por anos (Magnaval et al., 2001).

A infecção pré-natal ocorre após seis semanas de gestação, quando as larvas presentes nos tecidos da cadela grávida migram pela via transplacentária, por possíveis alterações hormonais. As larvas permanecem no fígado dos filhotes infectados até o nascimento, passando em seguida aos pulmões, traqueia, e tornando-se vermes adultos no intestino delgado. Os ovos podem ser eliminados com as fezes dos filhotes após quatro a cinco semanas do nascimento. Os filhotes também podem ser infectados através do aleitamento (infecção transmamária), fato que pode ocorrer após o nascimento, atingindo um pico na segunda semana de lactação. O ciclo biológico do *T. cati* nos gatos e outros felídeos é similar ao *T. canis*, com a exceção de que a infecção nos filhotes não ocorre pela via transplacentária (Glickman e Schantz, 1981).

Como consequência da contaminação ambiental, os ovos larvados de *Toxocara* podem infectar uma variedade de espécies não canídeas e felídeas por ingestão acidental. Quando ingeridas, as larvas são liberadas no intestino e invadem os tecidos somáticos através da circulação sanguínea e/ou linfática, podendo permanecer encapsuladas sem evoluir. Estes hospedeiros são denominados paratênicos (de transporte). Quando um canídeo ou felídeo preda um hospedeiro paratênico, as larvas (contidas nos tecidos somáticos) são liberadas diretamente no trato digestivo do hospedeiro definitivo, completando assim seu ciclo biológico sem migração traqueal (Overgaauw e van Knapen, 2013). Em relação ao *T. canis* há vários hospedeiros paratênicos como ratos, camundongos, pombos, porcos, galinhas, ovelhas, e outros (Glickman e Schantz, 1981).

O ser humano é considerado um hospedeiro paratênico acidental, infectando-se acidentalmente pela ingestão de ovos larvados presentes no solo ou em vegetais contaminados, bem como pelo consumo de tecidos crus ou mal cozidos de animais domésticos infectados com larvas do parasito. As larvas são liberadas no intestino delgado, penetram a mucosa intestinal e podem migrar para o fígado, pulmões, rins, coração, olhos e cérebro através dos vasos

sanguíneos (Dent et al., 1956; Smith et al., 2009). Esta migração larvária pode levar à hemorragia, necrose e infiltração de células inflamatórias. Muitas larvas podem permanecer quiescentes por longos períodos, podendo continuar posteriormente sua migração. Algumas larvas são destruídas pela resposta imune do hospedeiro, enquanto outras parecem se proteger desta resposta (Glickman e Schantz, 1981).

### 1.3 Formas clínicas da toxocaríase

A toxocaríase humana compreende vários sinais e sintomas, decorrentes da reação imunológica e inflamatória do hospedeiro contra a presença do parasito nos tecidos, especificamente contra os antígenos metabólicos e de superfície que são liberados pelas larvas de *Toxocara* durante sua migração (Kayes, 1997). O espectro de manifestações clínicas da toxocaríase pode variar amplamente desde casos assintomáticos até infecções sistêmicas e podem depender do número de ovos infectantes, da frequência de episódios de reinfecção, da localização das larvas no tecido ou órgão afetado, e da intensidade da resposta imune do hospedeiro (Kayes, 1997; Pawlowski, 2001).

A fase aguda da infecção ocorre imediatamente após a penetração das larvas no epitélio intestinal. Através dos vasos sanguíneos, elas migram para o fígado (primeiro órgão a ser afetado) e, a partir dele, podem migrar para outros órgãos, tais como coração, pulmões, baço, e rins, começando assim a fase crônica da infecção. Esta migração pode também incluir os olhos e o cérebro (Pawlowski, 2001; Smith et al, 2009). A migração das larvas pode gerar sintomas inespecíficos, como mialgia, febre, mal-estar, dor abdominal, sibilância e hiper-reatividade das vias respiratórias, especialmente em crianças ou pessoas predispostas (Magnaval et al., 2001).

Durante sua migração, as larvas de *Toxocara* liberam antígenos de excreção-secreção, que levam à ativação do sistema imunológico do hospedeiro, gerando mecanismos imunopatogênicos que originam as manifestações clínicas da doença. A resposta imune contra o parasito é mediada por células T auxiliares de tipo 1 (Th1) (que leva à formação de granulomas), mas com predominância de células T auxiliares de tipo 2 (Th2) (que contribui com a produção de anticorpos IgE e aumento do número de eosinófilos) (Sugane e Oshima, 1984; Kayes, 1997; Pawlowski, 2001). Em alguns casos, podem acontecer manifestações alérgicas atópicas ou relacionadas à eosinofilia, dependendo do tipo de resposta do indivíduo infectado. Até o momento não se conhece o mecanismo pelo qual as larvas de *Toxocara* conseguem modular a resposta imune, mas estudos recentes têm descrito que, de alguma forma, o parasito consegue induzir a secreção do fator

de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que ativa a via das células T reguladoras (Fan et al. 2013).

Várias classificações das formas clínicas da toxocaríase humana têm sido descritas na literatura. Baseados nas anteriores revisões de Glickman e Schantz (1981) e Magnaval et al. (2001), Smith et al. (2009) classificaram a toxocaríase humana em três formas principais: LMV, toxocaríase ocular e toxocaríase oculta. No entanto, Pawlowski (2001) classificou a toxocaríase humana em forma sistêmica, compartimentalizada, oculta e assintomática. Esta nova classificação leva em consideração o estado clínico observado, a implicação dos mecanismos imunopatológicos, a intensidade da resposta sorológica, e a localização de larvas de *Toxocara*. Alguns autores sugerem utilizar o termo específico “toxocaríase visceral” uma vez que o termo “larva migrans visceral” é genérico, podendo decorrer da migração de outros nematódeos (Khalil et al., 1989; Jacob et al., 1994; Yoshikawa et al., 2008).

### 1.3.1 Toxocaríase visceral (TV)

Descrita por Beaver et al. (1952) como síndrome de larva migrans visceral, caracteriza-se por elevada eosinofilia, hepatomegalia e/ou esplenomegalia, comprometimento pulmonar, febre, hipergamaglobulinemia, e elevados títulos de isoemaglutininas. Os casos de TV ocorrem usualmente em crianças (Schantz e Glickman, 1978; Magnaval et al, 2001; Despommier, 2003), podendo ocorrer apenas alguns sinais da forma clássica, como hepatomegalia e eosinofilia (Pawlowski, 2001). A eosinofilia crônica é um achado que leva frequentemente à suspeita de toxocaríase (Pawlowski, 2001; Kwon et al., 2006; Kim et al., 2008). Em casos que apresentam comprometimento pulmonar, pode ocorrer tosse seca, sibilância, broncoespasmo, pneumonite intersticial e derrame pleural (Roig et al, 1992; Ashwath et al, 2004). Alguns pacientes apresentam manifestações dermatológicas, como urticária e prurido (Gavignet et al., 2008). Outras manifestações também incluem artralgia, vasculite, efusão do pericárdio (Pawlowski, 2001; Despommier, 2003).

### 1.3.2 Toxocaríase ocular (TO)

Ocorre como consequência da invasão do globo ocular por larvas de *Toxocara*, causando uma série de condições clínicas, incluindo endoftalmite difusa, granulomas de polo posterior e periférico (Magnaval et al, 2001; Pawlowski, 2001; Despommier, 2003; Smith et al., 2009). A TO pode ser confundida com retinoblastoma, um tumor maligno que acomete principalmente

crianças (Wilder 1950; Magnaval et al, 2001; Despommier, 2003). A presença do parasito no globo ocular pode levar à perda da acuidade visual, uveíte e granulomas retinianos (Dernouchamps et al., 1990; Pawlowski, 2001; Despommier, 2003). Alguns pacientes apresentam dor ou sangramento devido à inflamação intraocular grave (Magnaval et al, 2001; Despommier, 2003).

### 1.3.3 Neurotoxocaríase (NT)

A NT é uma forma localizada da toxocaríase que ocorre como consequência da invasão do cérebro pelas larvas de *Toxocara*. No cérebro, as larvas não são encapsuladas e os vestígios da sua migração geralmente incluem pequenas áreas de necrose e infiltração inflamatória mínima. A NT varia desde casos assintomáticos até casos graves com déficit neurológico focal, convulsões, distúrbios no comportamento e meningoencefalite (Hill et al., 1985; Skerrett e Holland, 1997; Finsterer e Auer, 2007).

### 1.3.4 Toxocariase oculta

Do termo em inglês “covert toxocariasis” (CT), introduzido por Taylor et al. (1987), caracteriza-se por sinais e sintomas inespecíficos que não se enquadram nas formas viscerais, oculares ou neurológicas e afetam principalmente crianças. A CT parece estar relacionada com a resposta imunopatológica do hospedeiro em direção a um órgão e pela estimulação contínua dos antígenos do parasito (Pawlowski, 2001). A expressão clínica varia amplamente, podendo apresentar envolvimento pulmonar (episódios asmáticos, bronquite aguda, pneumonite com ou sem síndrome de Loëffler) (Feldman e Parker, 1992; Buijs et al., 1997; Inoue et al., 2002), doenças dermatológicas como urticária crônica ou eczema (Wolfrom et al., 1995.), linfadenopatia, miosite e síndrome pseudorreumática como artralgia (le Luyer et al., 1990; Kraus et al., 1995). Por outro lado, Glickman et al. (1987) descreveram em adultos uma forma clínica semelhante à descrita por Taylor, denominando-a “common toxocariasis” (Rubinsky-Elefant et al., 2010).

## 1.4 Diagnóstico da toxocaríase

Uma vez que o ser humano é um hospedeiro paratênico acidental, as larvas de *Toxocara* não evoluem a vermes adultos e, portanto, não são encontrados ovos do parasito no exame parasitológico das fezes (Rubinsky-Elefant et al., 2010). O diagnóstico da toxocaríase é geralmente baseado em



sinais e sintomas clínicos, dados epidemiológicos e laboratoriais (Magnaval et al., 2001; Despommier, 2003; Chieffi et al., 2009; Smith et al., 2009).

O diagnóstico definitivo da toxocaríase pode ser feito através da visualização das larvas nos tecidos infectados, através do exame histopatológico, que é demorado e possui baixa sensibilidade. É possível incrementar a sensibilidade utilizando técnicas de imunistoquímica para detectar antígenos do parasito nos granulomas (de Brito et al, 1994; Musso et al., 2007). Porém, por ser um método invasivo, a obtenção de uma biópsia de tecido é raramente justificada (Pawlowski, 2001; Rubinsky-Elefant et al., 2010).

Os métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do material genômico, em amostras clínicas e ambientais, já têm sido descritas, mas ainda não estão amplamente disponíveis (Fogt-Wyrwas et al., 2007; Zhu et al., 2001). Esses métodos podem ser ferramentas úteis para investigações epidemiológicas e moleculares da toxocaríase (Li et al., 2007).

As técnicas de diagnóstico por imagem, como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética têm sido utilizadas para o auxílio na detecção de lesões granulomatosas nos diferentes órgãos, tais como fígado, pulmões, sistema nervoso e olho, devido à migração de larvas de *Toxocara* (Magnaval et al, 2001; Watthanakulpanich, 2010).

Os exames laboratoriais (bioquímico, hematológico, parasitológico e imunológico) têm auxiliado o diagnóstico da toxocaríase. Na TV pode ser encontrada leucocitose com intensa eosinofilia, hipergamaglobulinemia e títulos elevados de isoemaglutininas (Jacob et al., 1994). Na TO, a eosinofilia pode estar ausente e o diagnóstico é geralmente baseado na avaliação clínica através de fundoscopia, para observar possíveis lesões oculares (granulomas retinianos ou periféricos e endoftalmite) (Glickman e Schantz, 1981). Na CT por sua vez, como os sintomas são inespecíficos, muitas vezes a eosinofilia é mínima ou encontra-se ausente (Magnaval et al., 2001).

Devido às limitações das técnicas parasitológicas tradicionais para o diagnóstico da toxocaríase em humanos, a detecção de anticorpos anti-*Toxocaraspp.* em fluidos biológicos (soro, líquido cefalorraquidiano ou humor aquoso) constitui uma importante ferramenta nos pacientes com suspeita clínica da doença (Magnaval et al., 2001; Vidal et al., 2003; De Visser et al., 2008; Smith et al., 2009).

Desde o início dos anos 1970, vários testes imunológicos têm sido descritos para a detecção de anticorpos contra o parasito, incluindo a reação intradérmica, fixação do complemento, floculação, imunodifusão, hemaglutinação indireta, imunofluorescência, radioimunoensaio e o ensaio

imunoenzimático. A qualidade dos antígenos para estes imunossaios também foi aprimorado, incluindo extratos somáticos de vermes adultos, ovos embrionados, larvas intactas ou seccionadas e produtos metabólicos de larvas infectantes do parasito (Glickman e Schantz, 1981).

Atualmente, os antígenos de excreção-secreção de larvas de *T. canis* (TES) são amplamente utilizados nos testes imunológicos tanto para o diagnóstico como para estudos seroepidemiológicos (Smith et al., 2009; Elefant et al., 2006). Estes antígenos, descritos pela primeira vez por De Savigny (1975), são obtidos a partir da manutenção *in vitro* de larvas infectantes. Desde então, várias modificações foram feitas aprimorando a qualidade do embrionamento dos ovos, a recuperação e a pureza das larvas obtidas e a redução do tempo de execução do protocolo (Bowman et al., 1987; Alcântara-Neves et al., 2008; Ponce-Macotela et al., 2011).

Os antígenos TES são compostos por cinco principais frações antigênicas de 26, 32, 45, 55, 70 e 120 kDa, quando analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e em condições redutoras (Maizels et al., 1984; Loukas et al., 2000a; Loukas et al., 2000b) e são altamente imunogênicos, levando ao aumento de anticorpos do tipo IgM, IgG, IgE e eosinofilia (Kayes e Oaks, 1980, Maizels et al., 1984; Del Prete, 1991).

Através de análises bioquímicas e físico-químicas, demonstrou-se que os antígenos TES são formados por uma mistura complexa de glicoproteínas (Akao et al., 1983; Sugane e Oshima, 1983; Maizels et al., 1984; Speiser e Gottstein, 1984; Badley et al., 1987), com algumas frações com atividade proteolítica (Robertson et al. 1989).

As glicoproteínas são constituídas de cadeias de oligossacarídeos ligadas covalentemente às estruturas peptídicas e são classificadas em O-glicosiladas (onde a N-acetilgalactosamina, o principal sacarídeo, encontra-se ligado à hidroxila do aminoácido serina ou treonina) e N-glicosiladas (onde a N-acetilglicosamina, o principal sacarídeo, encontra-se ligado ao nitrogênio da amida do aminoácido asparagina) (Mariño et al., 2010; Roth et al., 2012). As mucinas e os antígenos do grupo sanguíneo humano tipo ABO são exemplos de glicoproteínas O-glicosiladas, enquanto que as imunoglobulinas e o antígeno gp120 do vírus da imunodeficiência humana (HIV) são exemplos de glicoproteínas N-glicosiladas.

Nos antígenos TES, a fração de 120 kDa (TES-120) é o principal antígeno secretado pela larva durante sua migração ou quando mantida “*in vitro*” em meio de cultura (Maizels, 2013), sendo altamente O-glicosilada com estruturas muito semelhantes às glicanas do grupo sanguíneo humano ABO (Smith et al. 1983; Khoo et al., 1991). Por outro lado, a fração de 32 kDa (TES-

32) é o segundo maior antígeno secretado pela larva, sendo N-glicosilado com estruturas ricas em manose, semelhantes às glicanas presentes em alguns moluscos e plantas (Khoo et al. 1993; Maizels, 2013).

Várias estratégias de deglicosilação química ou enzimática têm sido descritas na literatura mundial e todas apontam que o processo depende do tipo de glicosilação (presença de O-glicanas ou N-glicanas), do grau de glicosilação (se os antígenos são altamente, medianamente ou fracamente glicosilados) e da eficiência dos agentes químicos ou enzimáticos envolvidos na reação (Mariño et al. 2010; Roth et al. 2012).

Na deglicosilação enzimática, várias enzimas têm sido utilizadas para eliminar estruturas glicosídicas de forma específica, mas a principal desvantagem deste procedimento é o alto custo das enzimas. Por outro lado, a deglicosilação química é um procedimento mais simples e econômico que pode eliminar de forma total ou parcial (dependendo das condições do ensaio) as glicanas de interesse. Dentre os agentes químicos, tem sido empregado o NaOH que, em baixas concentrações, é capaz de liberar as O-glicanas da cadeia polipeptídica por  $\beta$ -eliminação, e em concentrações maiores, também as N-glicanas (Roth et al., 2012).

O ácido trifluormetanossulfônico (TFMS) é um agente químico capaz de clivar todos os tipos de glicanas, mas o procedimento é complexo e requer temperaturas muito baixas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), sob uma atmosfera de nitrogênio gasoso e uso de vários reagentes (Edge 2003). Além disso, o TFMS não é eficiente para clivar a N-acetilglicosamina ligada à asparagina.

Outra estratégia para eliminar os epítomos glicosídicos é a desnaturação dos sacarídeos por oxidação com metaperiodato de sódio (Cao et al., 1997). Neste contexto, o periodato reage com os grupos dióis vicinais, alterando assim a estrutura conformacional do sacarídeo com formação de aldeídos. A reação usualmente é reduzida pela adição de boroidreto de sódio (Spiro, 1964).

O teste imunoenzimático ELISA, que utiliza os antígenos TES é o mais utilizado para a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp., apresentando maior sensibilidade e especificidade se comparado aos outros ensaios imunológicos (De Savigny, 1979; Magnaval et al., 2001; Elefant et al., 2006; Smith et al., 2009). No entanto, sua especificidade é diminuída em áreas onde o poliparasitismo é endêmico, com alta possibilidade de reatividade cruzada com outras helmintíases, reduzindo assim seu valor diagnóstico.

Vários autores têm reportado a ocorrência de resultados falso-positivos em pacientes com outras helmintíases, principalmente na ascaridíase, strongiloidíase, triquinose e fasciolose (Lynch et al., 1988; Jacquier et al., 1991; Ishida et al., 2003; Chieffi et al., 2009; Roldán et al., 2009; Smith et al.,

2009). Com a finalidade de reduzir essa reatividade cruzada, tem sido proposta a absorção prévia dos soros com extratos antigênicos de outros helmintos, incluindo *Ascaris suum* (Cypess et al., 1977; Lynch et al., 1988; Camargo et al., 1992; Nunes et al., 1997; Elefant et al., 2006).

Com o intuito de melhorar o imunodiagnóstico da toxocaríase, Magnaval et al. (1991) desenvolveram um teste de Western-blotting (WB) para a detecção específica de anticorpos IgG. Os soros de pacientes com toxocaríase reagiram contra sete frações proteicas do TES (24, 28, 30, 35, 132, 147 e 200 kDa), sendo que anticorpos contra frações de baixa massa molecular de 24 a 35kDa mostraram-se mais específicas ao gênero *Toxocara*, uma vez que soros de pacientes com outras helmintíases não reagiram contra essas frações. Vários autores também têm avaliado os antígenos TES pelo WB, reportando diferentes padrões de frações antigênicas (devido às diferentes condições de obtenção dos antígenos TES ou às condições da SDS-PAGE), mas todos concordam sobre a especificidade das frações de baixa massa molecular (Maizels et al., 1984; Nunes et al. 1997; Rubinsky-Elefant et al. 2011; Roldán e Espinoza 2009; Smith et al., 2009).

Vários autores têm mostrado que existe reatividade cruzada entre os antígenos de *T. canis* e *A. suum*, descrevendo-se que as frações antigênicas dos antígenos TES com massas moleculares de 81 kDa (Lynch et al., 1988), de 70 kDa (Kennedy et al., 1989) ou entre 55 e 66 kDa (Nunes et al., 1997) reagem em forma cruzada com os antígenos de *A. suum*. Além disso, Kennedy et al. (1989) também descreveram que o TES-120 reage de forma cruzada com *A. lumbricoides*.

Vários estudos têm mostrado que a maioria dos antígenos dos helmintos é composta por uma variedade de glicoproteínas ou glicolípídeos, que contêm epítomos glicídicos que reagem de forma cruzada com epítomos idênticos ou similares presentes em outros parasitos ligados filogeneticamente (Iglesias et al., 1996, Lorenzo et al., 2000, Restrepo et al., 2000, Casaravilla et al., 2003, Perteguer et al., 2003, Romasanta et al., 2003, Lozano et al., 2004). Essa poderia ser a causa de resultados falso-positivos, dificultando o sorodiagnóstico da toxocaríase. Quando a fração glicosídica dos antígenos é eliminada, muitas vezes é possível eliminar a reatividade cruzada dos anticorpos inespecíficos de forma total ou parcial (Lorenzo et al. 2000).

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o teste ELISA é amplamente utilizado para detectar anticorpos anti-*Toxocara* spp., no auxílio do sorodiagnóstico e inquéritos soroepidemiológicos da toxocaríase humana. No entanto, podem ocorrer reatividades cruzada sem regiões endêmicas para outras helmintíases, diminuindo assim a especificidade do teste. Os antígenos TES são glicoproteínas que possuem alto grau de glicosilação, (Khoo et al. 1991; Page e Maizels, 1992) e alguns autores têm reportado que as glicanas podem ser as responsáveis, em parte, pela reatividade cruzada entre os antígenos dos helmintos ou outros organismos (Lorenzo et al., 2000; Yamasaki et al., 2000; Romasanta et al., 2003; Hancock et al., 2008). A possibilidade de obtenção de antígenos TES deglicosilados, poderia melhorar o sorodiagnóstico da toxocaríase humana, reduzindo custos e tempo no preparo de extratos antigênicos de outros parasitos para absorção prévia dos soros (Lynch et al., 1988; Camargo et al., 1992; Elefant et al., 2006), bem como elevando a qualidade dos resultados em termos de sensibilidade e especificidade.

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 Geral

- Avaliar o efeito da deglicosilação dos antígenos TES e sua aplicabilidade no sorodiagnóstico da toxocaríase humana.

## 2.2 Específicos

- Obter antígenos TES deglicosilados, utilizando diferentes metodologias.
- Avaliar o desempenho diagnóstico dos antígenos TES deglicosilados, em comparação com os antígenos TES (não deglicosilados) por meio do teste ELISA, utilizando-se soros de pacientes com toxocaríase, soros de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras helmintíases.
- Avaliar os perfis de reatividade dos soros frente aos antígenos TES deglicosilados pelo Western-blotting.

### 3. MÉTODOS



### 3.1 Casuística

Para avaliar a sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA e Western-blotting utilizando os antígenos TES deglicosilados, foram utilizadas 58 amostras de soro de pacientes com características clínicas (compromisso pulmonar, hepatomegalia, dor abdominal), epidemiológicas (contato íntimo com cães) e laboratoriais (eosinofilia e presença de anticorpos IgG específicos pelo teste ELISA) de toxocaríase e 95 amostras de soro de indivíduos saudáveis. Para avaliar a reatividade cruzada, foram utilizadas 75 amostras de soros de pacientes infectados com as seguintes helmintíases: 13 com ascaridíase, 6 com tricuríase, 4 com ancilostomíase, 26 com estrogiloidíase, 14 com himenolepíase, 3 com difilobotríase, 6 com cisticercose, e 3 com fasciolose. Todos estes soros fazem parte de uma soroteca, já utilizada anteriormente para detecção de anticorpos anti-*Toxocara* spp. pelo teste ELISA (Elefant et al., 2006) e possuem termo de anuência para sua utilização em estudos de pesquisa (anexo nº 1). Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (CEP-FMUSP nº 9208) (anexo nº 2).

### 3.2 Produção de antígenos de excreção-secreção de larvas infectantes de *Toxocara canis* (TES)

Os antígenos de excreção-secreção de larvas infectantes de *T. canis* (TES) foram obtidos por meio de cultura “in vitro” seguindo o protocolo descrito por De Savigny (1975) com algumas modificações realizadas por Elefant et al. (2006). Fêmeas adultas de *T. canis* foram obtidas do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura do Município de São Paulo. Ovos de *T. canis* foram obtidos por dissecação do útero das fêmeas e mantidos em solução de formalina 2%, por 30 a 40 dias, com agitação e aeração diária para permitir o embrionamento dos ovos. Após este período, os ovos embrionados foram lavados três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,85%) por centrifugação a 1.200 x g por 3 minutos. Em seguida, os ovos foram ressuspensos em solução de hipoclorito de sódio a 5% e mantidos à temperatura ambiente (T.A.) por aproximadamente 10 minutos, para remoção das camadas proteica e quitinosa da membrana do ovo. Após este tratamento, os ovos foram lavados com solução fisiológica por aproximadamente cinco vezes, até a completa remoção do hipoclorito. A seguir, os ovos foram ressuspensos em meio de cultura Eagle (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO USA) contendo 80 µg/mL de gentamicina e logo transferidos assepticamente para um frasco tipo Erlenmeyer contendo pérolas de vidro; a mistura foi agitada por 15 minutos para auxiliar no rompimento dos ovos e liberação das larvas. A solução contendo as larvas foi transferida para um funil de Baermann modificado, para permitir a migração

das larvas por 18 horas a 37°C. Após este período de incubação, as larvas foram coletadas em tubos de cultura e mantidas a 37°C em condições estéreis.

Semanalmente, os sobrenadantes dos tubos foram coletados e logo acrescentados com uma nova alíquota de meio de cultura Eagle. Os sobrenadantes coletados foram acrescidos do inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO USA) à concentração final de 5mM, e logo conservadas a -20°C. Esses sobrenadantes foram descongelados, misturados e concentrados de 50 a 100 vezes, com membrana Amicon YM10 (Merck-Millipore, USA) e dialisados contra água destilada. Após a diálise, a solução foi centrifugada a 18.000 x g por 30 minutos a 4°C, filtrada em membrana de 0,22 µm (Merck-Millipore, USA) e seu conteúdo proteico foi determinado pelo método de Lowry et al. (1951). Os antígenos TES foram armazenados em alíquotas a -20°C até o momento do uso.

### 3.3 Deglicosilação dos antígenos TES

Com o objetivo de eliminar os epítomos das estruturas glicosídicas dos antígenos TES, estes foram deglicosilados quimicamente através de β-eliminação com hidróxido de sódio ou oxidação com metaperiodato de sódio.

#### 3.3.1 Tratamento com hidróxido de sódio (β-eliminação)

A deglicosilação dos antígenos TES foi realizada por tratamento com hidróxido de sódio (NaOH), baseado em métodos publicados por diferentes autores (Ogata e Lloyd 1982; Page e Maizels, 1992; Duk et al. 1997; Hong e Kim, 2000; Hanisch et al. 2009). Uma alíquota de 90 µL dos antígenos TES (1,5 mg/mL) foi misturada com 10 µL de diferentes concentrações de NaOH para obtenção das concentrações finais de 25, 50 e 100mM. As misturas foram incubadas às temperaturas de 4, 37 e 56°C, por 3 horas. Após o término da incubação, a mistura foi neutralizada pela adição de uma concentração equimolar de ácido clorídrico. Os produtos resultantes foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

#### 3.3.2 Tratamento com metaperiodato de sódio (oxidação dos carboidratos)

Os carboidratos dos antígenos TES foram oxidados segundo o método de Zancopé-Oliveira et al. (1994), com algumas modificações. Uma alíquota de 90 µL dos antígenos TES (1,5 mg/mL) foi misturada com 10 µL de diferentes

concentrações de metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) para obtenção das concentrações finais de 25, 50 e 100 mM e incubadas a 4°C por 18 horas em câmara escura. Após a oxidação, o metaperiodato residual foi consumido pela adição de 10  $\mu\text{L}$  de glicerol 20% e incubado por 15 minutos à T.A. e, posteriormente adicionou-se uma quantidade equimolar de boroidreto de sódio. Os produtos resultantes foram analisados através de SDS-PAGE.

### 3.3.3. Teste de estabilidade dos antígenos TES deglicosilados

Para avaliar a estabilidade dos antígenos TES deglicosilados, um lote foi dividido em quatro alíquotas e mantido às temperaturas de -20°C, 4°C, 22°C (temperatura ambiente), e 37°C durante uma, duas e quatro semanas. Após estes períodos de armazenamento, as diferentes alíquotas foram testadas para detecção de anticorpos IgG pelo teste ELISA, frente a um pool de soros de pacientes com toxocaríase com alta reatividade (CP1) e, com reatividade intermediária (CP2), e um pool de soros de indivíduos saudáveis com reatividade próxima ao valor limiar (CN1) e abaixo do valor do limiar (CN2); as leituras das densidades ópticas obtidas foram comparadas, sendo o controle de referência, o armazenamento a -20°C.

### 3.4 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os antígenos TES (na forma nativa ou tratados com NaOH) foram separados por SDS-PAGE em condições reduzidas, segundo Laemmli (1970). Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra 5X (concentração final de Tris-HCl 0,01M; pH 6,8; SDS 1%, ureia 6%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.005%) e incubados a 95°C por 4 minutos. Em seguida, os antígenos TES foram aplicados em gel de poli(acrilamida) a 12%. A eletroforese foi realizada em aparelho Mini-Protean II (Bio-Rad), a uma voltagem constante de 100V por 10 minutos e 150V até o momento em que o azul de bromofenol atingisse o final do gel. Como controle, foi utilizado um padrão de massa molecular (Pierce Prestained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL USA) contendo as frações de 20, 25, 35, 50, 85 e 120 kDa. Após a corrida eletroforética de três géis nas mesmas condições já descritas, um deles foi corado com nitrato de prata para análise de proteínas, o segundo foi corado com ácido periódico de Schiff para análise de carboidratos, e o terceiro foi eletrotransferido para membranas de nitrocelulose pela técnica de Western-blotting.

#### 3.4.1 Coloração do gel com nitrato de prata

O gel de poliacrilamida contendo os antígenos TES foi corado com nitrato de prata, segundo a técnica descrita por Nielsen e Brown (1984). Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em ácido tricloroacético 10% por uma hora a 4°C. Após três lavagens de 10 minutos cada com etanol 10% e ácido acético 5%, o gel foi imerso em solução oxidante (dicromato de potássio 0,1% em ácido nítrico 0,2%) por 5 minutos. O gel foi lavado duas vezes com água deionizada por 5 min cada e colocado em solução de nitrato de prata 0,2%, por 30 minutos no escuro. Em seguida, o gel foi lavado em água deionizada por 1 minuto e logo imerso em solução redutora (carbonato de sódio 7,4% em formaldeído 0,037%) durante 1 minuto e três trocas de nova solução redutora por 30 segundos cada, até a aparição de bandas, de cor marrom escuro. O gel foi finalmente lavado duas vezes com ácido acético 5% e conservado em água destilada. Todas as etapas da coloração foram realizadas sob constante agitação.

#### 3.4.2 Coloração do gel com ácido periódico de Schiff (PAS)

O gel de poliacrilamida contendo os antígenos TES, foi corado com ácido periódico de Schiff (PAS), segundo a técnica descrita por Maizels et al. (1991). Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em isopropanol 25% e ácido acético 10%, por 18 horas a 4°C e lavado duas vezes por 15 minutos cada com ácido acético 7,5%. Em seguida, o gel foi imerso em solução oxidante (ácido periódico 0,4%), por 1 hora a 4°C e, sem efetuar a lavagem, o gel foi imerso em reagente de Schiff por 1 hora a 4°C no escuro. Foram feitas três lavagens de 10 minutos cada com solução redutora (metabissulfito de potássio 0,5%) no escuro, até a aparição das bandas de cor fúcsia. O gel foi lavado com ácido acético 7,5% por 5 minutos e guardado na mesma solução a 4°C.

#### 3.5 Teste ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A detecção de anticorpos IgG, IgM e IgE anti-*Toxocara* spp. foi realizada pelo teste ELISA segundo De Savigny et al. (1979), com modificações descritas por Elefant et al. (2006). Os testes foram padronizados com diferentes diluições de antígeno, soro e anticorpos secundários conjugados, e tempos de incubação com o intuito de obter os melhores resultados.

Placas de poliestireno com fundo plano (Costar<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO USA) foram sensibilizadas (100 µL/poço) com antígenos TES (1,9 µg/mL) ou dTES (1 µg/mL) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,01M,

pH 9,6, por 2 h a 37°C e em seguida por 18 h a 4°C, em câmara úmida. Após sensibilização, as placas foram lavadas por 5 minutos com solução salina tamponada com fosfatos 0,01M, pH 7,2 (PBS) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e depois foram bloqueadas (200 µL/poço) com albumina de soro bovino 1% em PBS-T, por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T por 30 segundos cada, e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para detecção de anticorpos IgG e IgM, as amostras de soro foram diluídas a 1/160 em PBS-T e foram incubadas (100 µL/poço) por 40 min a 37°C. Para a detecção de anticorpos IgE, as IgGs do soro foram depletadas por precipitação, pelo tratamento com anticorpos de carneiro anti-IgG humana (RF-absorbent®, Siemens Healthcare, USA). As amostras foram diluídas a 1/20 com o RF-absorbent, incubadas a 4°C por 18 horas e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados, diluídos a 1/2 com PBS-T (diluição final de 1/40), e incubados (100 µL/poço) por 2 horas a 37°C.

As placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas (100 µL/poço) com anti-imunoglobulinas humanas conjugados à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO USA) diluídos em PBS-T: anti-IgG 1/10.000 por 40 minutos a 37°C, anti-IgM 1/4.000, e anti-IgE 1/2.000 por 60 minutos a 37°C.

Após três ciclos de lavagem com PBS-T, as placas foram incubadas (50 µL/poço) com solução cromogênica de ortofenilenodiamina e peróxido de hidrogênio-ureia (0,4mg/mL) em tampão citrato-fosfato 0,05M (OPD Fast™, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO USA), por 15 minutos a 37°C e a reação enzimática foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas foram obtidas em um leitor de placas de ELISA Titertek Multiskan MCC/340 (Lab-system, Helsinki, Finland) a um comprimento de onda de 492 nm.

Os limiares de reatividade (cut-off) para cada teste ELISA foram calculados utilizando a curva ROC (características de operação do receptor) visando os melhores valores de sensibilidade e especificidade. Como controle de cada ensaio, foram incluídos soros positivos e negativos, além de um soro limiar de reatividade, com uma densidade óptica similar ao valor do cut-off (Rubinsky-Elefant et al., 2013).

### 3.6 Western-blotting (WB)

Os antígenos TES, separados por SDS-PAGE, foram transferidos eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA USA), segundo Towbin et al. (1979), em aparelho Mini

Trans-Blot II (BioRad) à voltagem constante de 100V, durante 1 hora a 4°C. Em seguida, as membranas de nitrocelulose foram lavadas por 30 minutos com PBS-T, cortadas em fitas de 3 mm de largura e bloqueadas com albumina de soro bovino 1% e leite desnatado 3% em PBS-T, por 1 hora à T.A. e lavadas por 5 minutos com PBS-T. As amostras de soro foram diluídas a 1/50 em solução de bloqueio e incubadas com as fitas de nitrocelulose por 2 horas à T.A. para detecção de anticorpos IgG; 4 horas à T.A. para detecção de anticorpos IgM; ou 12 horas a T.A. para detecção de anticorpos IgE e sob agitação constante. Após incubação, as fitas foram lavadas três vezes com PBS-T, por 7 minutos cada; e em seguida, foram incubadas por 90 minutos à T.A com anti-imunoglobulinas humanas conjugadas à peroxidase (anti-IgG 1/6.000; anti-IgM 1/2.000; anti-IgE 1/1.000; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO USA) e diluídas em solução de bloqueio,. Após três novos ciclos de lavagem com PBS-T, as fitas foram incubadas com solução cromogênica (3,3'-tetraidrocloro de diaminobenzidina 0,0005%; peróxido de hidrogênio 0,01% em PBS, pH 7,2) por 3 minutos à T.A. e finalmente lavadas três vezes com água destilada para interromper a reação enzimática. Resultados positivos no WB foram evidenciados pela presença de frações de cor marrom escuro. Todos os volumes das amostras e reagentes empregados foram de 1 mL e em todos os ensaios foram utilizados soros padrão positivo e negativo como controle.

### 3.7 Deglicosilação “in situ” dos antígenos TES

Com o objetivo de analisar quais frações dos antígenos TES seriam afetadas pelo tratamento com NaOH e NaIO<sub>4</sub>, foi realizado um tratamento “in situ” nas membranas de nitrocelulose contendo os antígenos TES (previamente separados por eletroforese e eletrotransferidos às membranas como já foi descrito anteriormente) seguindo o procedimento descrito por Langley et al. (1994) e Duk et al. (1997). Os antígenos TES foram incubados com NaOH ou NaIO<sub>4</sub> nas concentrações finais de 25, 50 e 100 mM a 37°C, durante 4 horas. Após o término da incubação, as fitas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e logo três vezes com PBS, por 5 minutos. Em seguida, as fitas foram bloqueadas e submetidas a WB frente a soros padrão (positivo e negativo) para pesquisa de anticorpos IgG, IgM e IgE.

### 3.8 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados estatisticamente com os programas SigmaStat® e GraphPad Prism®. A sensibilidade, especificidade e os valores preditivos da detecção de anticorpos IgG, IgM e IgE anti-*Toxocara*

spp. contra os antígenos TES e dTES foram analisados pelas curvas ROC (Zou et al., 2007). A concordância entre os testes utilizando os antígenos TES e dTES foi calculada utilizando o índice Kappa (Langenbucher et al. 1996).

Para avaliar o efeito da deglicosilação dos antígenos TES no sorodiagnóstico da toxocaríase humana nas diferentes amostras de soro, foram aplicados os testes t de Student para dados paramétricos e o teste de Wilcoxon para dados não paramétricos. Todas as probabilidades dos testes foram realizadas para um nível de confiança de 95%.

Para avaliar a estabilidade dos antígenos dTES às diferentes temperaturas de armazenamento de -20°C, 4°C, 22°C e 37°C, utilizou-se a análise de variância simples (one way ANOVA) e para avaliar a estabilidade ao longo do período de uma, duas e quatro semanas às diferentes temperaturas, utilizou-se o one way ANOVA para medidas repetidas (one way RM ANOVA) com um nível de confiança de 95%.

## 4. RESULTADOS

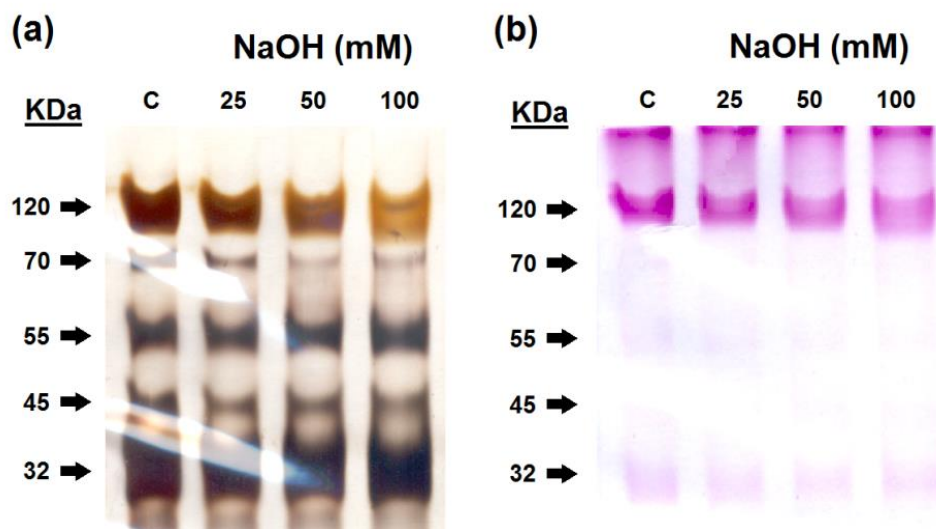


## 4.1 Deglicosilação dos antígenos TES

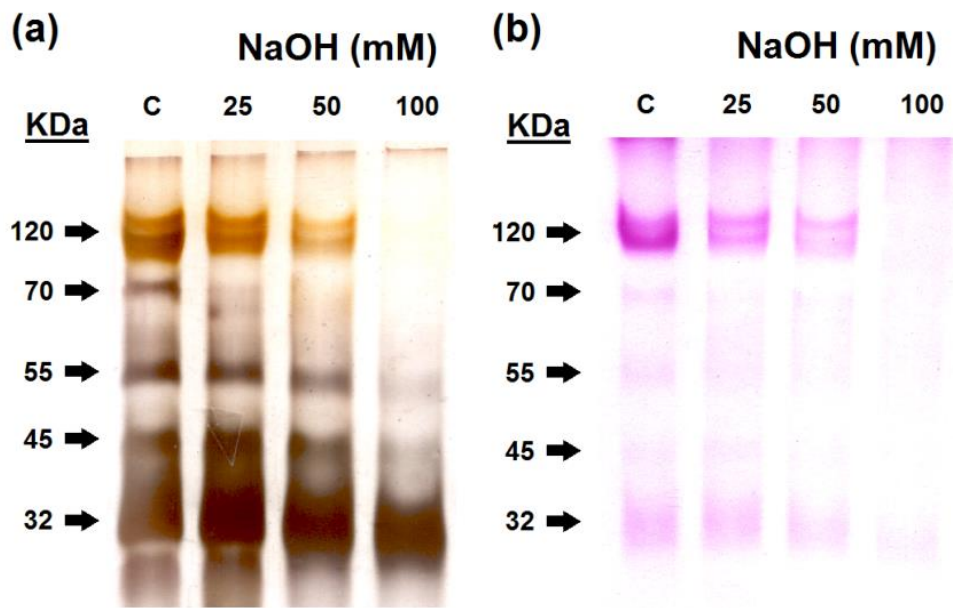
### 4.1.1 Tratamento dos antígenos TES com hidróxido de sódio

O tratamento dos antígenos TES com NaOH apresentou variações segundo os tempos e temperaturas de incubação. À temperatura de 4°C, mesmo por 24 horas, não houve eficiência na deglicosilação dos antígenos TES (Figura 2). Quando a temperatura foi aumentada para 37°C, a deglicosilação foi mais eficiente na concentração de 100 mM de NaOH, atuando principalmente nas frações de 70 e 120 kDa e com um efeito parcial nas demais frações antigênicas (Figura 3). Este efeito foi dependente do tempo de incubação, pois o NaOH exerceu um efeito proteolítico em concentrações a partir de 50 mM quando a incubação foi prolongada para 24 horas (Figura 4).

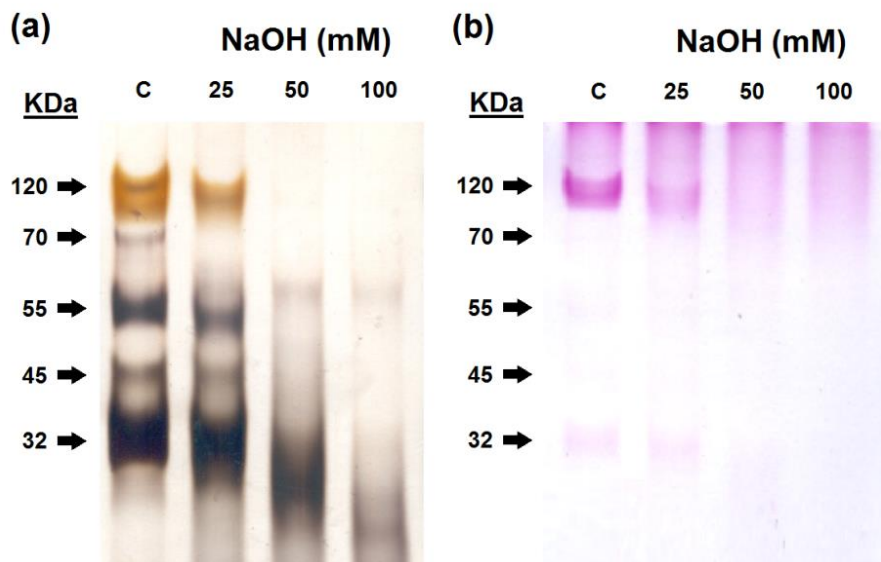
À temperatura de 56°C, o NaOH exerceu um efeito proteolítico sobre a maioria das frações dos antígenos TES, exceto na fração de 55 kDa (Figura 5).



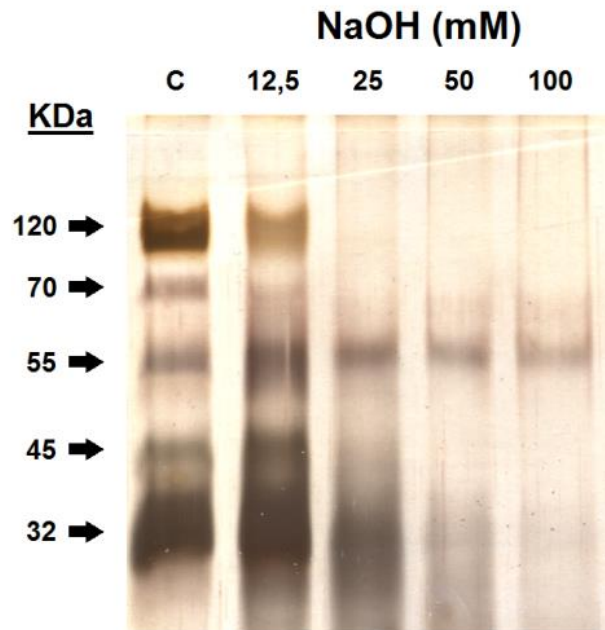
**Figura 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos de excreção e secreção de larvas de *Toxocara canis* (TES) tratados com diferentes concentrações de NaOH a 4°C por 24 horas e corados com nitrato de prata (a) ou ácido periódico de Schiff (PAS) (b). C = controle (sem tratamento). A massa molecular está expressa em kDa.



**Figura 3.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 37°C durante 3 horas e corados com nitrato de prata (a) ou PAS (b). C = controle (sem tratamento). A massa molecular está expressa em kDa.



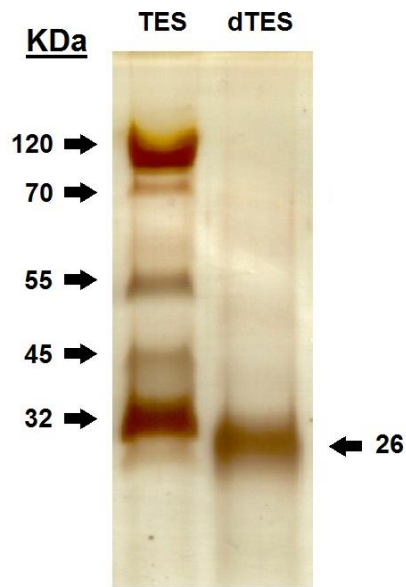
**Figura 4.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 37°C por 24 horas e corados com nitrato de prata (a) ou PAS (b). C = controle. A massa molecular é expressa em kDa.



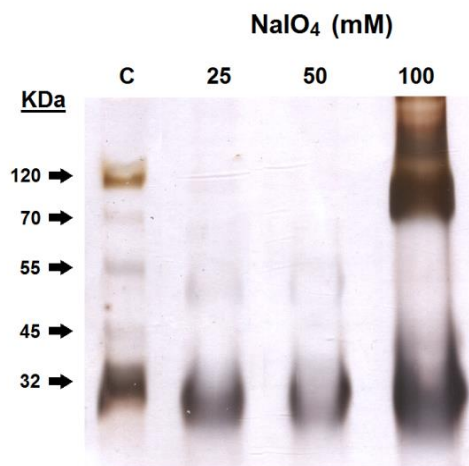
**Figura 5.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% dos antígenos TES tratados com diferentes concentrações de NaOH a 56°C por 3 horas e corados com nitrato de prata. C = controle(sem tratamento). A massa molecular está expressa em KDa.

#### 4.1.2 Tratamento dos antígenos TES com metaperiodato de sódio

O tratamento em solução dos antígenos TES com  $\text{NaIO}_4$  não se mostrou muito adequada se comparada ao NaOH, com desaparecimento de frações dos antígenos TES em concentrações menores de  $\text{NaIO}_4$  e aparecimento de outras frações na concentração de 100 mM de  $\text{NaIO}_4$  (Figura 7). Além disto, a fração de 26 kDa não se mostrou definida. Diante destes resultados, optou-se por continuar a deglicosilação dos antígenos TES com NaOH.



**Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e coloração com nitrato de prata dos antígenos TES tratados a 37°C por 4 horas com 100mM de NaOH para obtenção de um produto deglicosilado (dTES) com uma aparente massa molecular de 26 KDa.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e coloração com nitrato de prata do tratamento dos antígenos TES com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>). C = controle. A massa molecular é expressa em KDa.

## 4.2 Teste ELISA

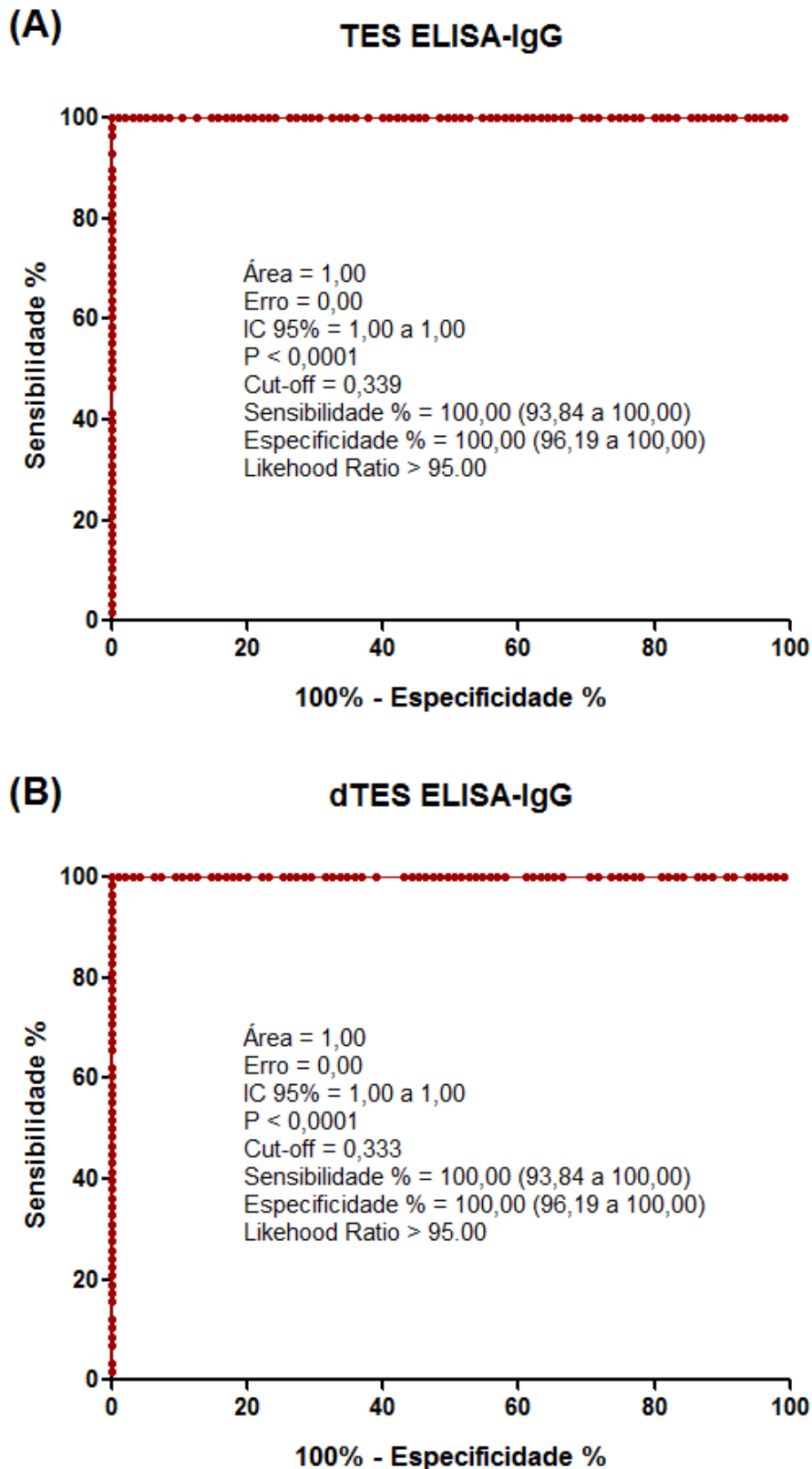
### 4.2.1 ELISA-IgG

As curvas ROC apresentaram uma área de 1,00 (IC95%= 1,000 – 1,00;  $p < 0,0001$ ) para ambos os antígenos TES e dTES com sensibilidades e especificidades máximas de 100%(Figura 8). Os limiares de reatividade (cut-off) calculados para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. foram 0,339 (likelihood ratio > 95,00) para os antígenos TES e 0,333 (likelihood ratio >95,00) para dTES (Figura 8). Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as medianas das densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis e dos pacientes com toxocaríase quando foram testados contra os antígenos TES ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U test) e dTES ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U test).

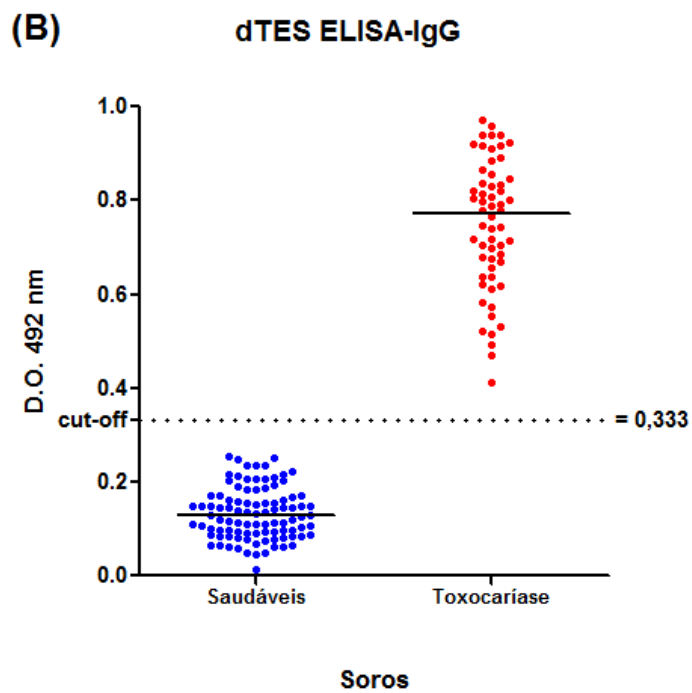
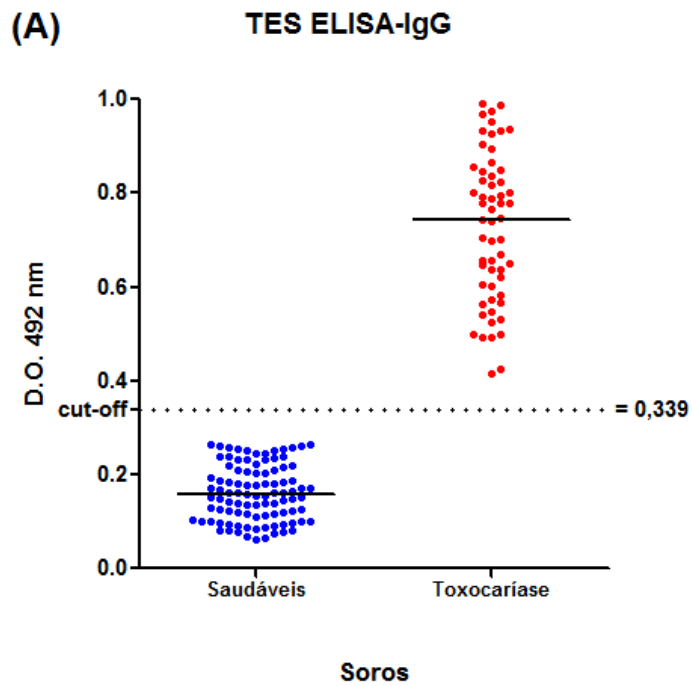
Os soros de indivíduos saudáveis apresentaram densidades ópticas entre 0,063 e 0,265 (média = 0,161; mediana = 0,158) contra os antígenos TES e densidades ópticas entre 0,015 e 0,253 (média = 0,133; mediana = 0,128) contra os antígenos dTES. A diferença entre estes valores foi estatisticamente significativa com uma mediana mais baixa quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test) (Figura 9).

Todas as amostras dos pacientes com toxocaríase apresentaram anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. com densidades ópticas entre 0,414 e 0,992 (média = 0,727; mediana = 0,744) quando avaliadas contra os antígenos TES e densidades ópticas entre 0,413 e 0,972 (média = 0,748; mediana = 0,772) quando avaliadas contra os antígenos dTES. A diferença entre estes valores foi estatisticamente significativa com uma mediana maior quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p = 0,004$ ; Wilcoxon signed-rank test) (Figura 9). O grau de concordância entre os testes de ELISA feitos com ambos os antígenos foi excelente na discriminação entre os soros positivos e negativos (índice Kappa = 1; IC 95% = 0,95 – 1,03).

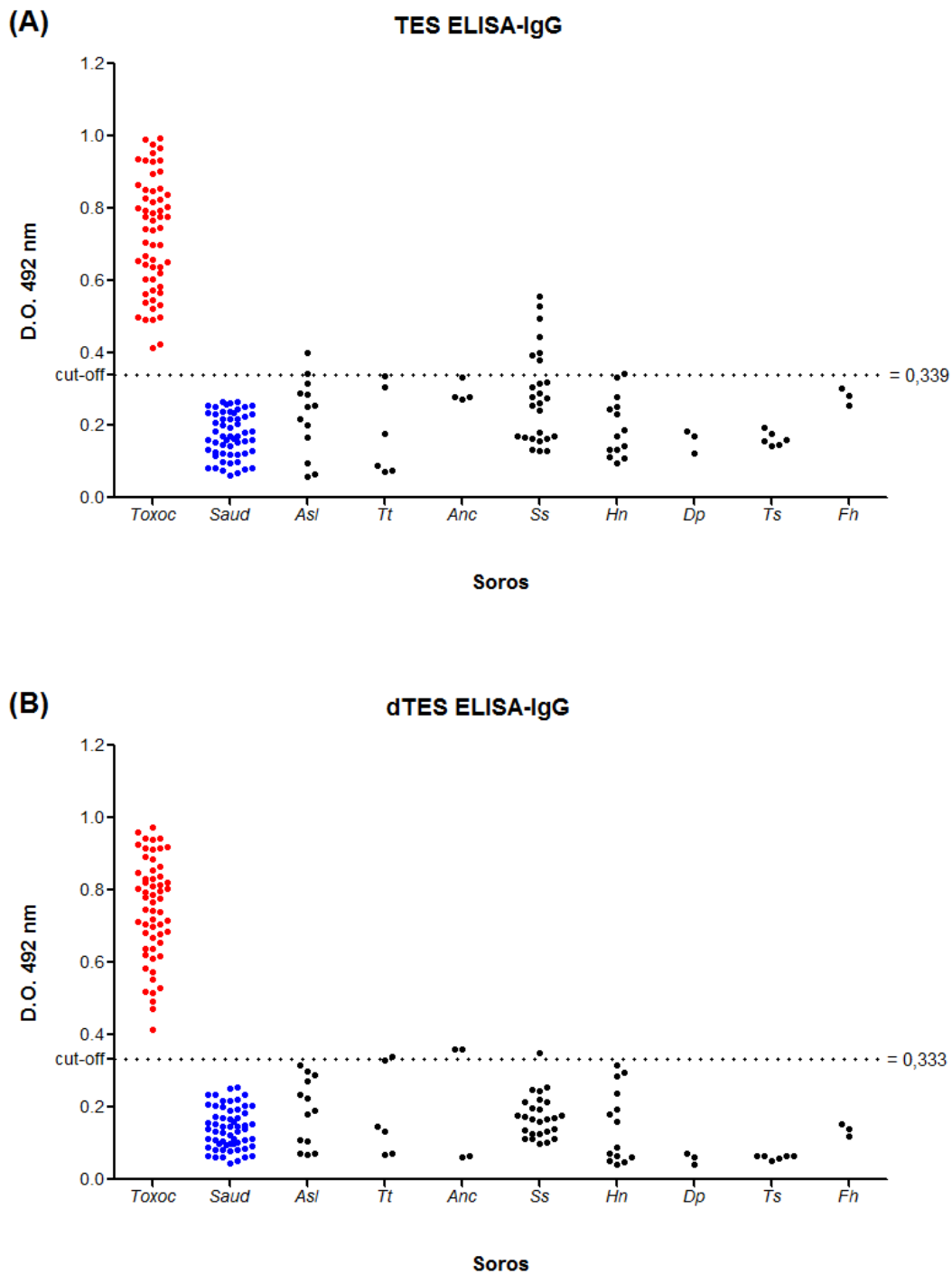
Encontrou-se reatividade cruzada em 13,3% dos soros de pacientes com outras helmintíases (2 pacientes com ascaridíase, 7 pacientes com estrogiloidíase e 1 paciente com himenolepiíase) quando avaliados contra os antígenos TES. No entanto, essa reatividade diminuiu para 5,3% (1 paciente com trichuríase, 2 pacientes com ancilostomíase e 1 paciente com estrogiloidíase) quando foram utilizados os antígenos dTES, sendo esta proporção estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ; Fisher exact test) (Figura 10). A análise de comparação entre as medianas das densidades ópticas dos soros de pacientes com outras helmintíases, testados contra ambos os antígenos, revelou que existe uma maior discriminação quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test).



**Figura 8.** Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) testados a uma diluição de 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.



**Figura 9.** Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis ( $n=95$ ) e de pacientes com toxocaríase ( $n=58$ ) diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off para cada antígeno está representado pela linha pontilhada.



**Figura 10.** Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: *Ascaris lumbricoides* (Asl = 13), *Trichuris trichiura* (Tt = 6), *Ancylostoma* spp (Anc = 4), *Strongyloides stercoralis* (Ss = 26), *Hymenolepis nana* (Hn = 14), *Diphyllobothrium pacificum* (Dp = 3), cisticercose por *Taenia solium* (Ts = 6) e *Fasciola hepatica* (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.



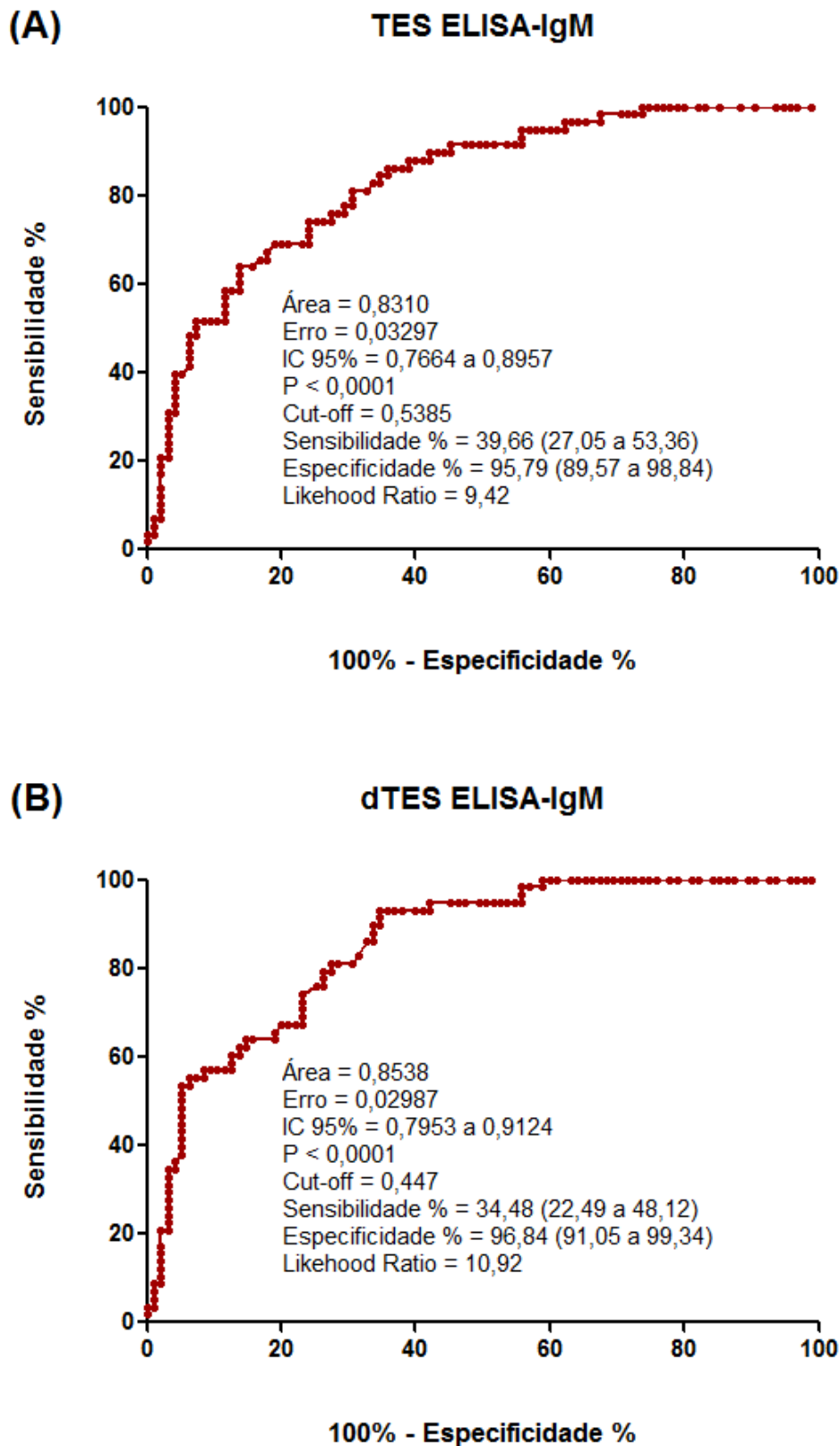
#### 4.2.2 ELISA-IgM

As curvas ROC para detecção de anticorpos IgM anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES e dTES apresentaram áreas de 0,831(IC95%= 0,7664-0,8957;  $p < 0,0001$ ) e 0,8538 (IC95%= 0,7953-0,900;  $p < 0,0001$ ) com sensibilidades de 39,66% e 34,48%, e especificidades de 95,79% e 96,84%, respectivamente. Os limiares de reatividade (cut-offs) calculados foram 0,539 (likelihood ratio = 9,42) para os antígenos TES e 0,447 (likelihood ratio = 10,92) para dTES (Figura 11).

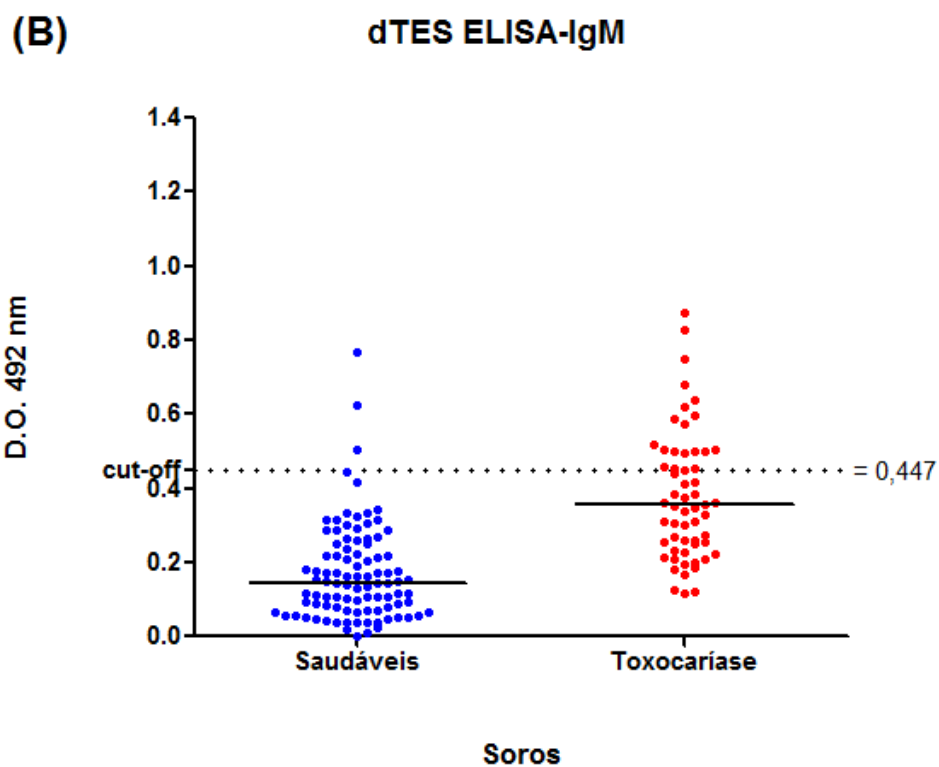
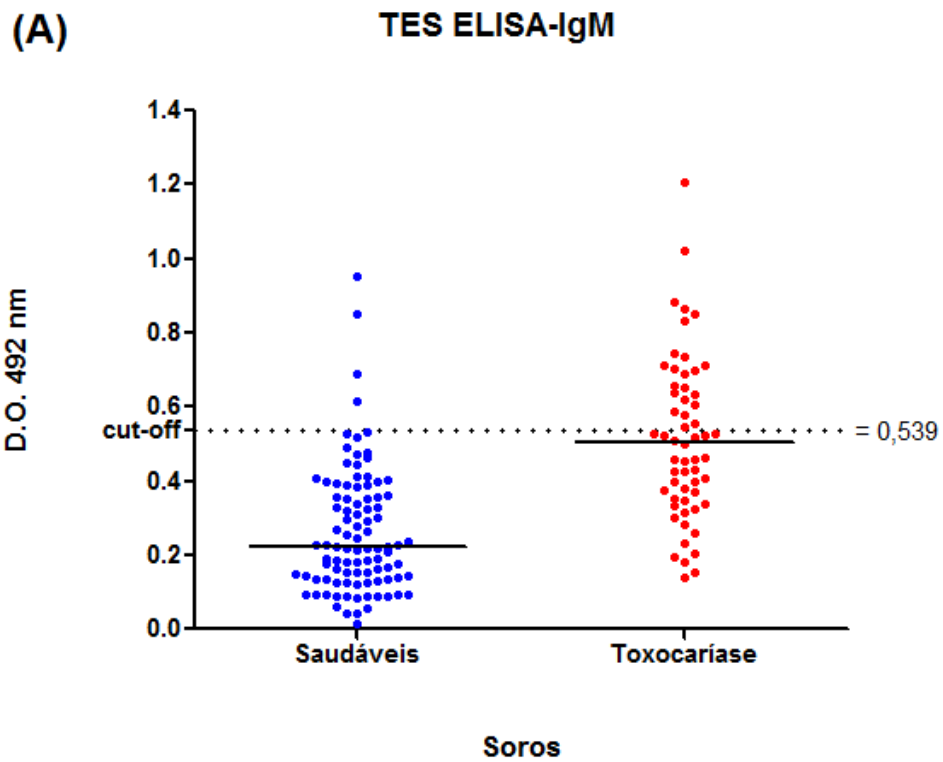
Os soros de indivíduos saudáveis apresentaram densidades ópticas entre 0,013 e 0,951 (média = 0,264; mediana = 0,221) contra os antígenos TES e densidades ópticas entre 0,003 e 0,767 (média = 0,177; mediana = 0,144) contra os antígenos dTES. A diferença entre estes valores foi estatisticamente significativa com medianas mais baixas quando os antígenos dTES foram utilizados ( $p < 0,001$ ; Mann-Whitney U test).

Os soros dos pacientes com toxocaríase apresentaram anticorpos IgM anti-*Toxocara* spp. com densidades ópticas entre 0,141 e 1,205 (média = 0,513; mediana = 0,504), com uma positividade de 39,66% (23/58) quando avaliadas contra os antígenos TES. No entanto, essa positividade foi diminuída para 34,48% (20/58) quando foram avaliados contra os antígenos dTES, apresentando densidades ópticas entre 0,115 e 0,872 (média = 0,379; mediana = 0,354) (Figura 12). Embora exista uma boa concordância entre os dois antígenos para detecção de anticorpos IgM (Índice kappa = 0,84; IC95% = 0,78 - 0,86), houve uma diminuição estatisticamente significativa na reatividade quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test).

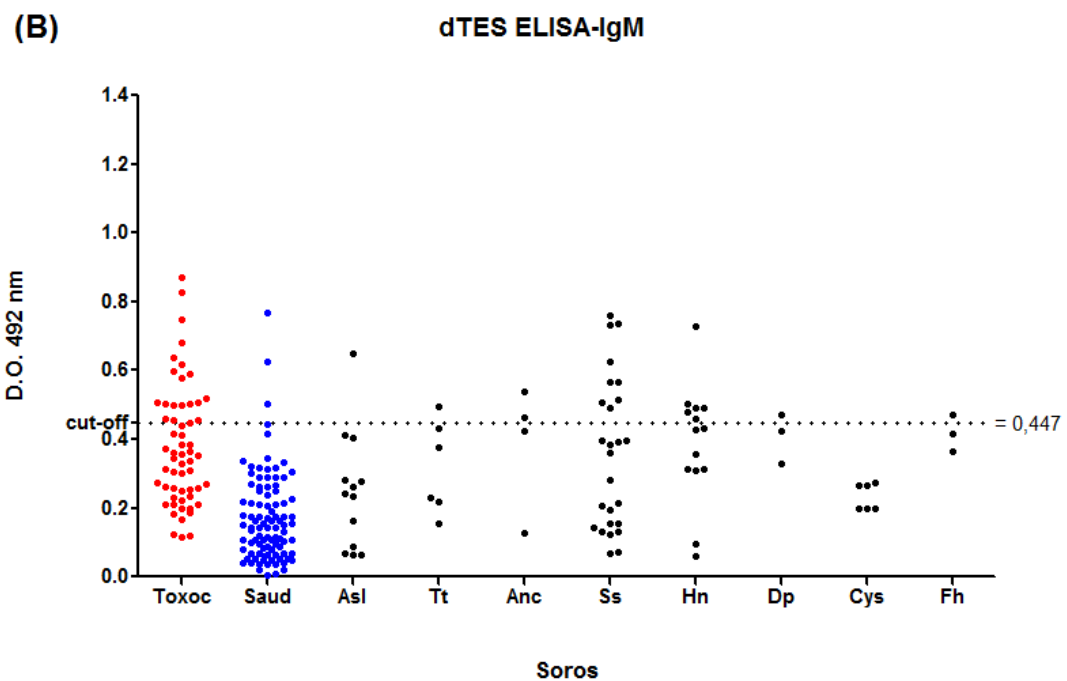
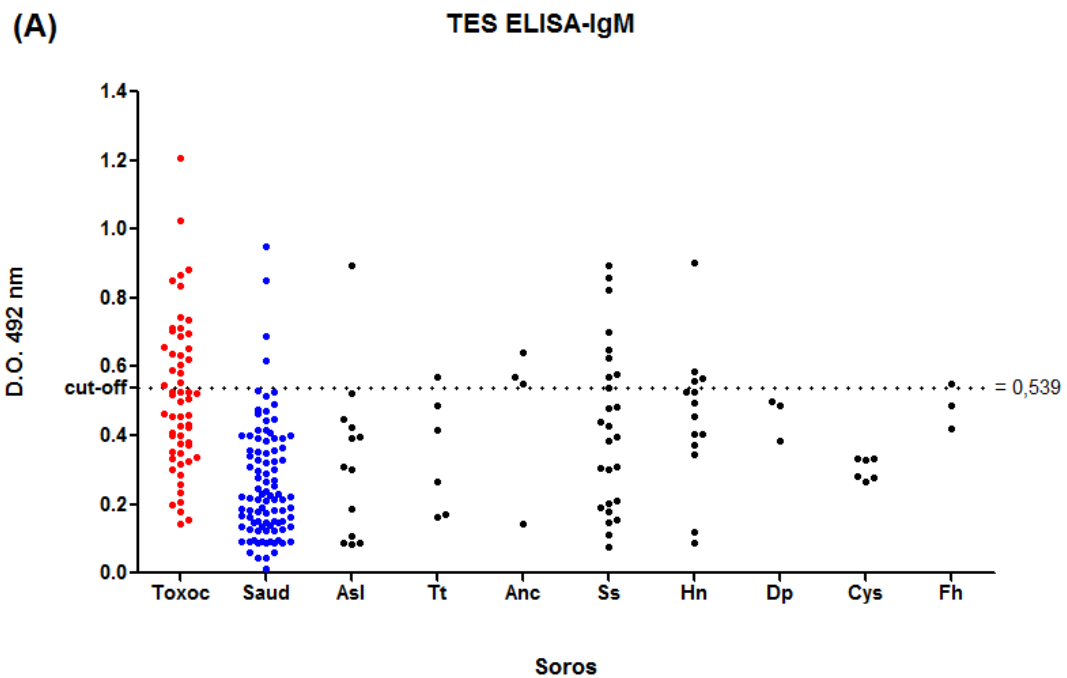
Dos soros de pacientes com outras helmintíases, encontrou-se 24% (18/75) de reatividade cruzada em (1 paciente com ascaridíase, 1 paciente com tricuríase, 3 pacientes com ancilostomíase, 8 pacientes com estrogiloidíase, 4 pacientes com himenolepíase e 1 paciente com fasciolose) quando avaliados contra os antígenos TES. No entanto, essa reatividade aumentou para 28% (21/75) (1 paciente com ascaridíase; 1 paciente com tricuríase, 2 pacientes com ancilostomíase, 9 pacientes com estrogiloidíase, 6 pacientes com himenolepíase, 1 paciente com difilobotríase e 1 paciente com fasciolose) quando foram utilizados os antígenos dTES, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ; Fisher exact test). A análise de comparação entre as medianas das densidades ópticas dos soros de pacientes com outras helmintíases, testados contra ambos os antígenos, revelou que existe uma menor discriminação quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test) (Figura 13).



**Figura 11.** Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis ( $n = 95$ ) e de pacientes com toxocaríase ( $n = 58$ ) testados a uma diluição de 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.



**Figura 12.** Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis ( $n=95$ ) e de pacientes com toxocaríase ( $n=58$ ) diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.



**Figura 13.** Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: *Ascaris lumbricoides* (Asl = 13), *Trichuris trichiura* (Tt = 6), *Ancylostoma* spp (Anc = 4), *Strongyloides stercoralis* (Ss = 26), *Hymenolepis nana* (Hn = 14), *Diphyllobothrium pacificum* (Dp = 3), cisticercose por *Taenia solium* (Ts = 6) e *Fasciola hepatica* (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/160 para detecção de anticorpos IgM anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. O valor do cut-off está representado pela linha pontilhada.

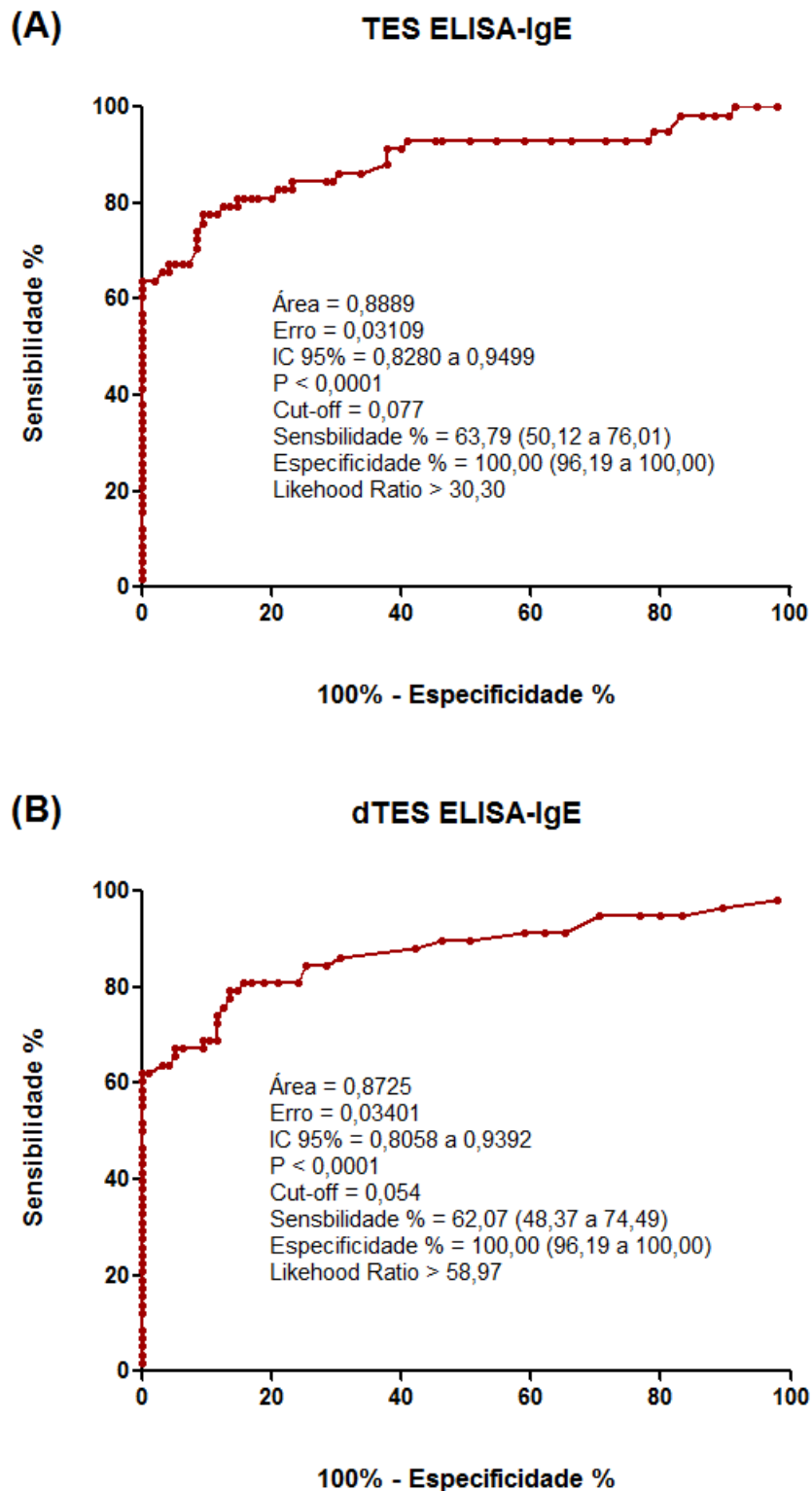
### 4.2.3 ELISA-IgE

As curvas ROC para detecção de anticorpos IgE anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES e dTES apresentaram áreas de 0,889(IC95%= 0,828-0,900;  $p < 0,0001$ ) e 0,873 (IC95%= 0,8058-0,900;  $p < 0,0001$ ) com sensibilidades de 63,79% e 62,07% e especificidades de 100% e 100%, respectivamente. Os limiares de reatividade (cut-offs) calculados foram 0,077 (likelihood ratio  $> 30,30$ ) para antígenos TES e 0,054 (likelihood ratio  $> 58,97$ ) para dTES (Figura 14).

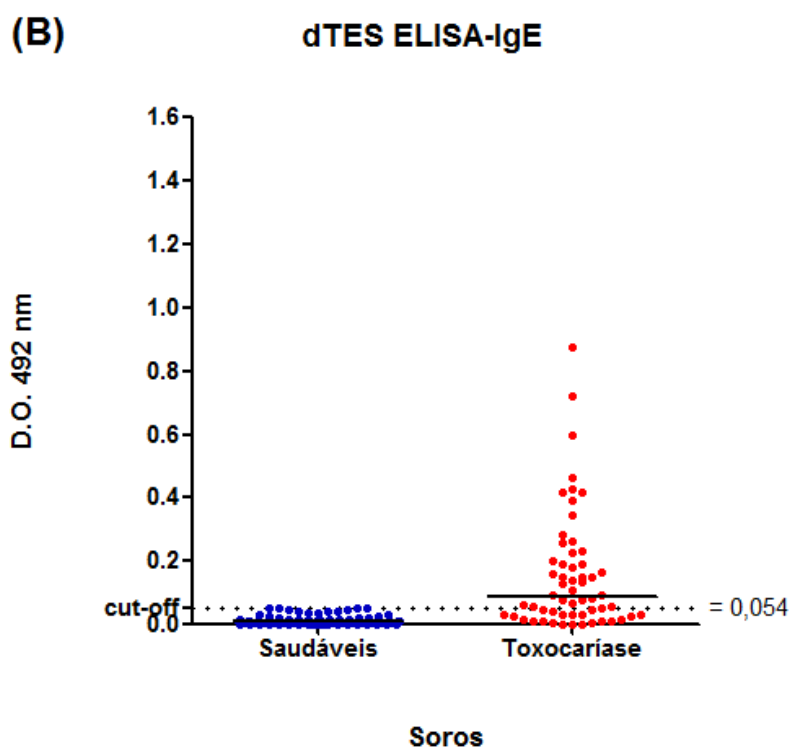
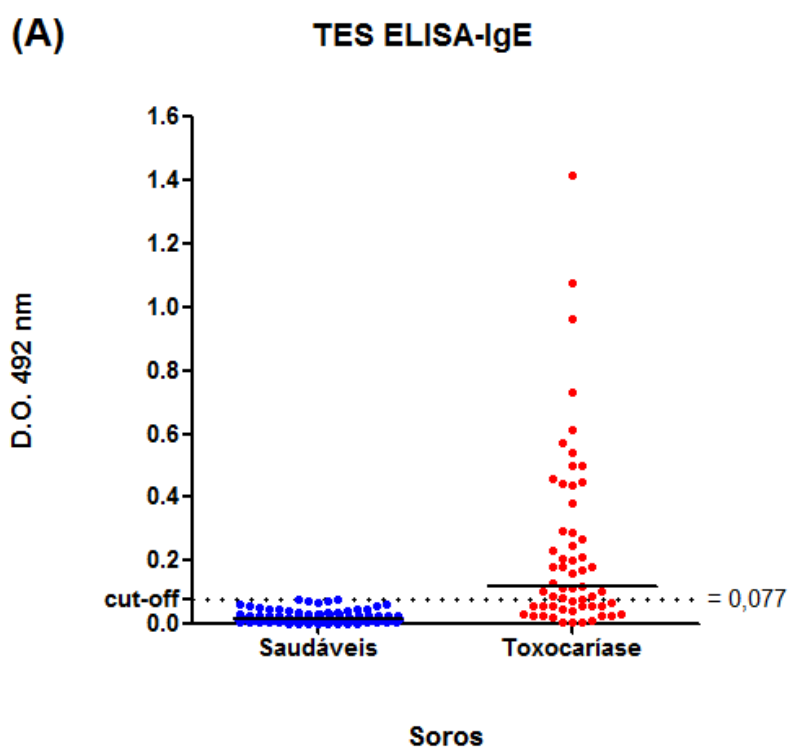
Os soros de indivíduos saudáveis apresentaram densidades ópticas entre 0,001 e 0,076 (média = 0,024; mediana = 0,018) contra os antígenos TES e entre 0,000 e 0,052 (média = 0,014; mediana = 0,010) contra os antígenos dTES. A diferença entre estes valores foi estatisticamente significativa com medianas mais baixas quando foram utilizados os antígenos dTES ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test).

Das 58 amostras de soro dos pacientes com toxocaríase, só 36 apresentaram reatividade contra os antígenos TES, com densidades ópticas entre 0,004 e 0,417 (média = 0,237; mediana = 0,117). Por outro lado, 37 amostras desses pacientes apresentaram reatividade contra os antígenos dTES, com densidades ópticas entre 0,000 e 0,878 (média = 0,158; mediana = 0,089) (Figura 15). Houve diferença estatisticamente significativa entre as densidades ópticas obtidas empregando-se os dois antígenos ( $p < 0,001$ ; Wilcoxon signed-rank test). O grau de concordância entre os testes foi considerado perfeito (Índice kappa = 1,0; IC 95% = 0,95 - 1,02).

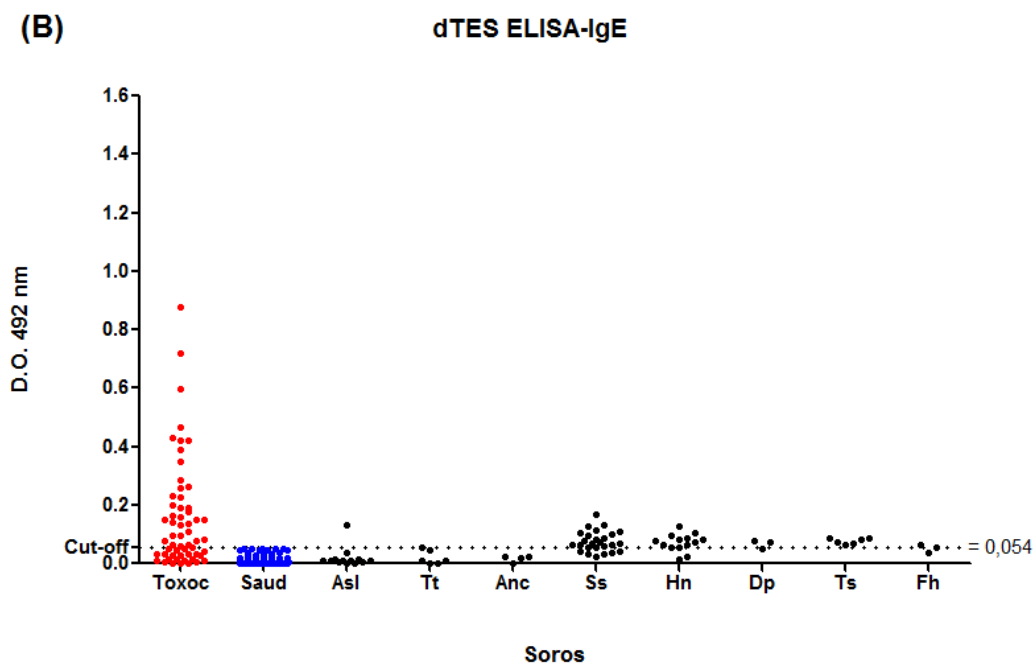
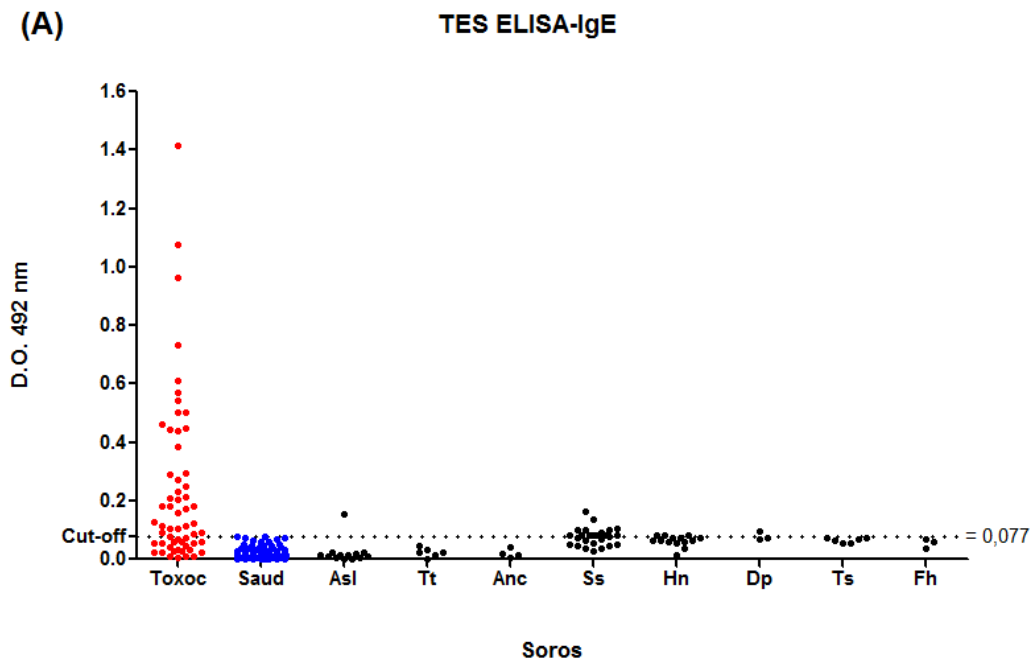
Dos soros de pacientes com outras helmintíases, encontrou-se reatividade cruzada em 26,6% (20/75) (1 paciente com ascaridíase, 15 pacientes com estrongiloidíase, 3 pacientes com himenolepíase e 1 paciente com difilobotríase) quando avaliados contra os antígenos TES. No entanto, essa reatividade aumentou para 53,3% (43/75) (1 paciente com ascaridíase; 1 paciente com trichuríase, 20 pacientes com estrongiloidíase, 12 pacientes com himenolepíase, 2 pacientes com difilobotríase, 6 pacientes com cisticercose e 1 paciente com fasciolose) quando foram utilizados os antígenos dTES, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ; Fisher exact test). No entanto, a comparação entre as medianas das densidades ópticas dos soros de pacientes com outras helmintíases testadas contra ambos os antígenos revelou que não existe diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,545$ ; Wilcoxon signed-rank test) (Figura 16).



**Figura 14.** Curvas de características de operação do receptor (ROC) dos soros de indivíduos saudáveis (n = 95) e de pacientes com toxocaríase (n = 58) testados a uma diluição de 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B), pelo teste ELISA.



**Figura 15.** Densidades ópticas dos soros de indivíduos saudáveis ( $n= 95$ ) e de pacientes com toxocaríase ( $n= 58$ ) diluídos a 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. Os valores do cut-off estão representados pela linha pontilhada.



**Figura 16.** Densidades ópticas dos soros de pacientes com toxocaríase (Toxoc = 58); indivíduos aparentemente saudáveis (Saud = 95) e pacientes infectados com outras helmintíases: *Ascaris lumbricoides* (Asl = 13), *Trichuris trichiura* (Tt = 6), *Ancylostoma* spp (Anc = 4), *Strongyloides stercoralis* (Ss = 26), *Hymenolepis nana* (Hn = 14), *Diphyllobothrium pacificum* (Dp = 3), cisticercose por *Taenia solium* (Ts = 6) e *Fasciola hepatica* (Fh = 3). Os soros foram diluídos a 1/40 para detecção de anticorpos IgE anti-*Toxocara* spp. contra os antígenos TES (A) e dTES (B) pelo teste ELISA. Os valores do cut-off estão representados pela linha pontilhada.



### 4.3 Western-blotting (WB)

#### 4.3.1 WB-IgG

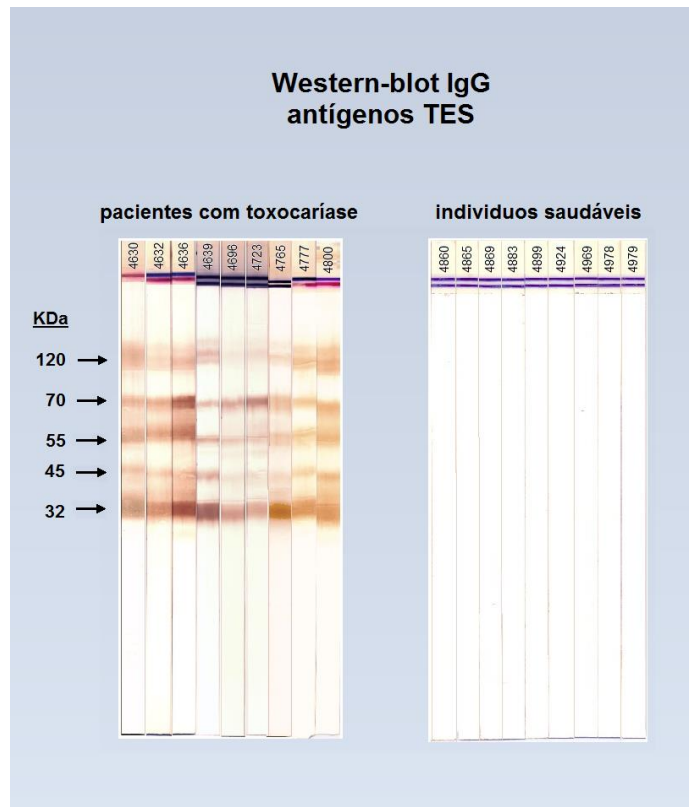
Todos os 58 soros de pacientes com toxocaríase reagiram contra as cinco frações dos antígenos TES (32, 45, 55, 70, e 120 kDa)(Figura 17), obtendo-se uma sensibilidade de 100%, sendo que 10,3% (6/58) apresentaram fraca reatividade contra a fração de 120 kDa e 19% (11/58) apresentaram fraca reatividade contra a fração de 45 kDa. No entanto, todos eles apresentaram reatividade contra a única fração de 26 kDa dos antígenos dTES, obtendo-se também uma sensibilidade de 100% (Figura 18). Por outro lado, nenhum dos 95 soros de indivíduos saudáveis apresentaram reatividade contra as cinco frações dos antígenos TES, e tampouco com a fração de 26 kDa dos antígenos dTES, obtendo-se uma especificidade de 100% para ambos os antígenos.

Em relação às outras helmintíases (Figura 19), 100% (13/13) dos soros dos pacientes com ascaridíase apresentaram reatividade contra as frações de 70 kDa e 85% (11/13) contra a fração de 55 kDa e 85% (11/13) apresentaram fraca reatividade contra a fração de 32 kDa. Uma das cinco amostras de soro de pacientes com trichuríase apresentou reatividade contra as frações de 120, 70 e 55 kDa dos antígenos TES. Duas amostras de soro de pacientes com ancilostomíase apresentaram reatividade contra as frações de 70 e 55 kDa e uma delas também apresentou uma fraca reatividade contra a fração de 32kDa.

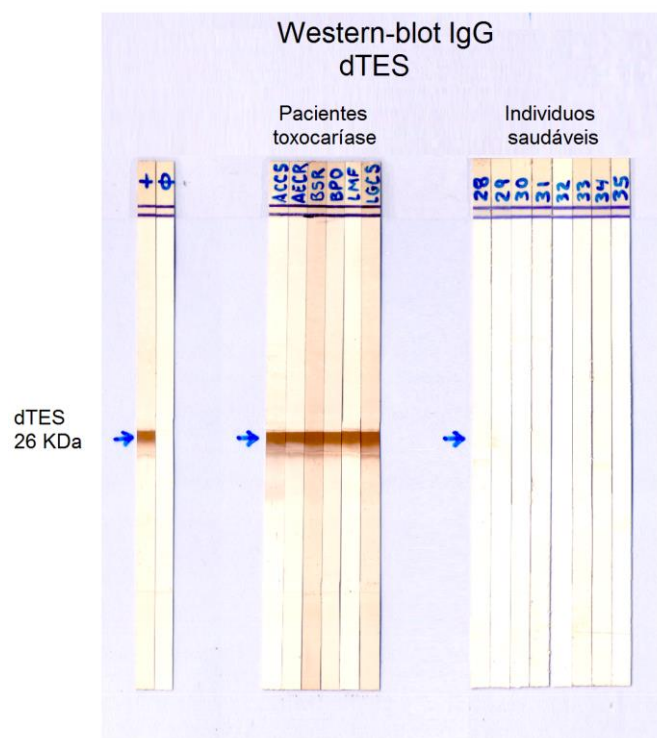
Nos soros de pacientes com estrogiloidíase, 23,1%(6/26) apresentaram reatividade contra a fração de 70 kDa; 26,9% (7/26)apresentaram fraca reatividade contra a fração de 55 kDa e 19,2% (5/26) apresentaram fraca reatividade contra a fração de 32 kDa. A metade dos soros de pacientes com himenolepiase (7/14) apresentaram reatividade contra a fração de 70 kDa dos antígenos TES, três amostras de soro (21,4%) apresentaram reatividade contra a fração de 55 kDa e 2 amostras (14,3%) apresentaram reatividade contra a fração de 32 kDa.

Não houve reatividade contra os antígenos TES nas amostras de soro de pacientes com difilobotríase, cisticercose e fasciolose.

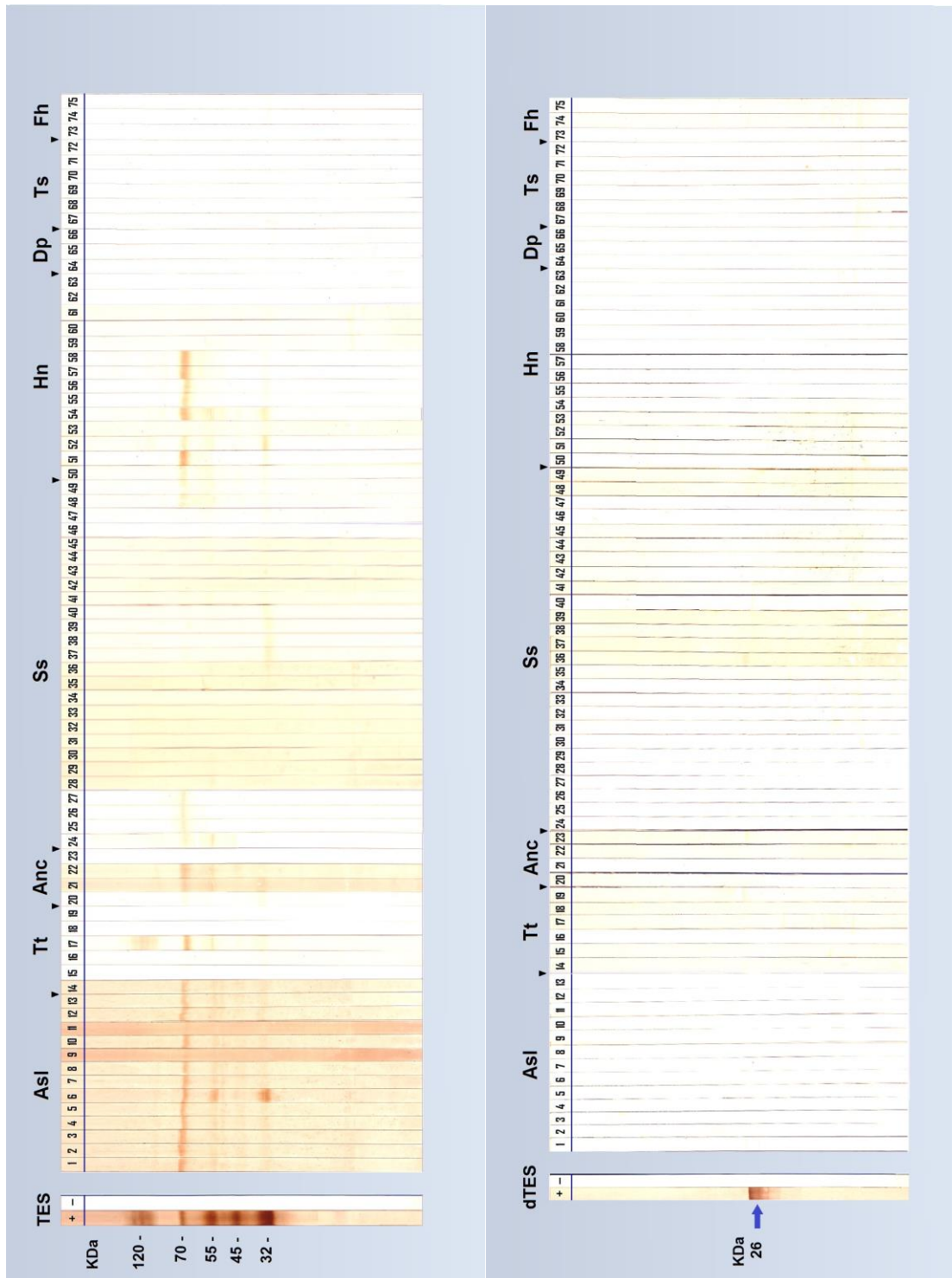
Na avaliação dos soros de pacientes com outras helmintíases contra os antígenos dTES, não houve reatividade, exceto um soro de paciente com *Strongyloides stercoralis* que reagiu fracamente (este soro também mostrou reatividade contra a fração de 32 kDa dos antígenos TES).



**Figura 17.** Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.



**Figura 18.** Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.



**Figura 19.** Reatividade de anticorpos IgG pelo Western-blotting frente aos antígenos TES (esquerda) e dTES (direita), em soros de pacientes infectados com *Ascaris lumbricoides* (Asl = 13), *Trichuris trichiura* (Tt = 6), *Ancylostoma* spp (Anc = 4), *Strongyloides stercoralis* (Ss = 26), *Hymenolepis nana* (Hn = 14), *Diphyllobothrium pacificum* (Dp = 3), cisticercose por *Taenia solium* (Ts = 6) e *Fasciola hepatica* (Fh = 3), diluídos a 1/50.

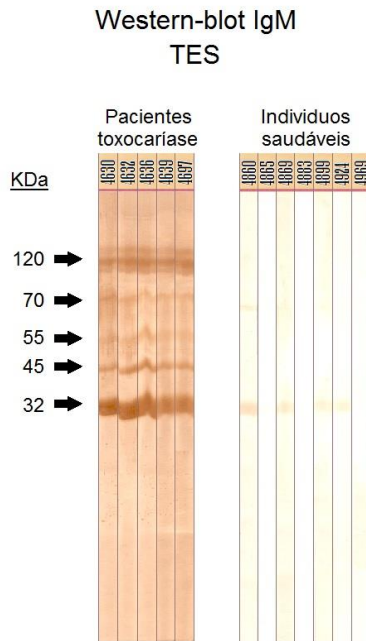
#### 4.3.2 WB-IgM

Dos 58 soros de pacientes com toxocaríase, 55 reagiram pelo menos contra uma das frações dos antígenos TES (sensibilidade 94,8%). Todos os 55 soros reagiram contra a fração de 32 kDa, 58,2% (32/55) reagiram contra a fração de 70 kDa e 50,9% (28/55) reagiram contra a fração de 120 kDa (Figura 20). Por outro lado, esses mesmos 55 soros reagiram contra a única fração dos antígenos dTES (Figura 21).

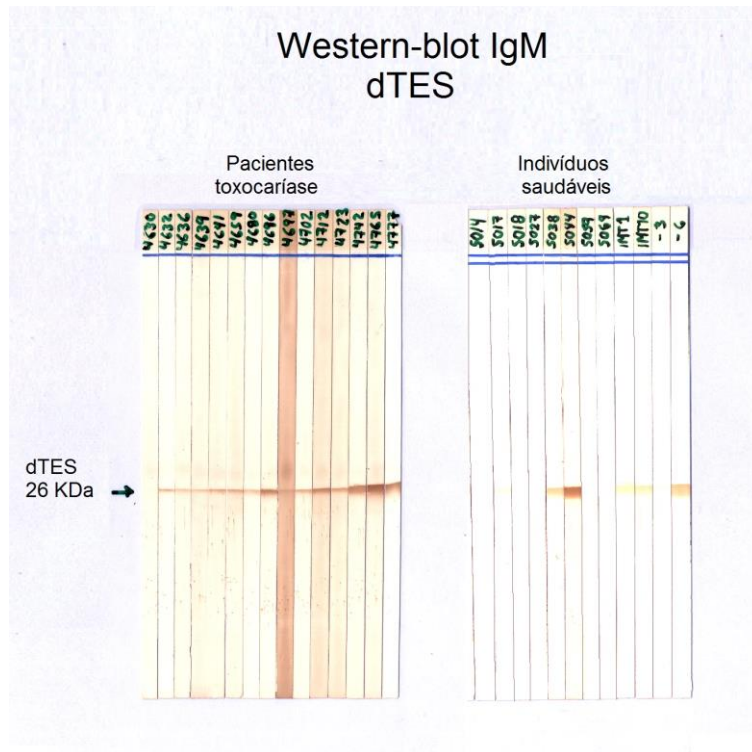
Dos soros de indivíduos saudáveis, 39 reagiram pelo menos contra uma das frações dos antígenos TES (especificidade de 58,95%). Todos estes 39 soros apresentaram reatividade contra a fração de 32 kDa, e 30 destes soros reagiram também contra a fração de 70 kDa (Figura 20). Por outro lado, esses mesmos soros reagiram contra a única fração dos antígenos dTES (Figura 21).

Em relação às outras helmintíases frente aos antígenos TES, soros de pacientes com ascaridíase reagiram contra as frações de 32 kDa: 100% (13/13); 45 kDa: 30,77% (4/13); 55 kDa: 53,84% (7/13); 70 kDa: 23,07% (3/13) e 120 kDa: 92,3% (12/13). Soros de pacientes com trichuríase reagiram contra as frações de 32, 55 e 70 kDa: 66,6% (4/6) e 120 kDa: 50% (3/6). Soros de pacientes com ancilostomíase reagiram contra as frações de 32 kDa e 120 kDa: 100% (4/4), 55 kDa: 50% (2/4); 70 kDa e 75% (3/4). Soros de pacientes com estrongiloidíase reagiram contra as frações de 32 kDa: 34,6% (9/26) e 70 kDa: 15,38% (4/26). Soros de pacientes com himenolepíase reagiram contra as frações de 32 kDa: 71,43% (10/14); 70 kDa: 28,57% (4/14) e 120 kDa: 64,29% (9/14). Todos os soros de pacientes com difilobotríase (3/3) apresentaram reatividade contra as frações de 32 kDa, 70 kDa e 120 kDa. Soros de pacientes com cisticercose reagiram contra as frações de 32 kDa: 50% (3/6) e 120 kDa: 16,6% (1/6). Todos os soros de pacientes com fasciolose apresentaram reatividade fraca apenas contra a fração de 32 kDa (Figura 22 - esquerda).

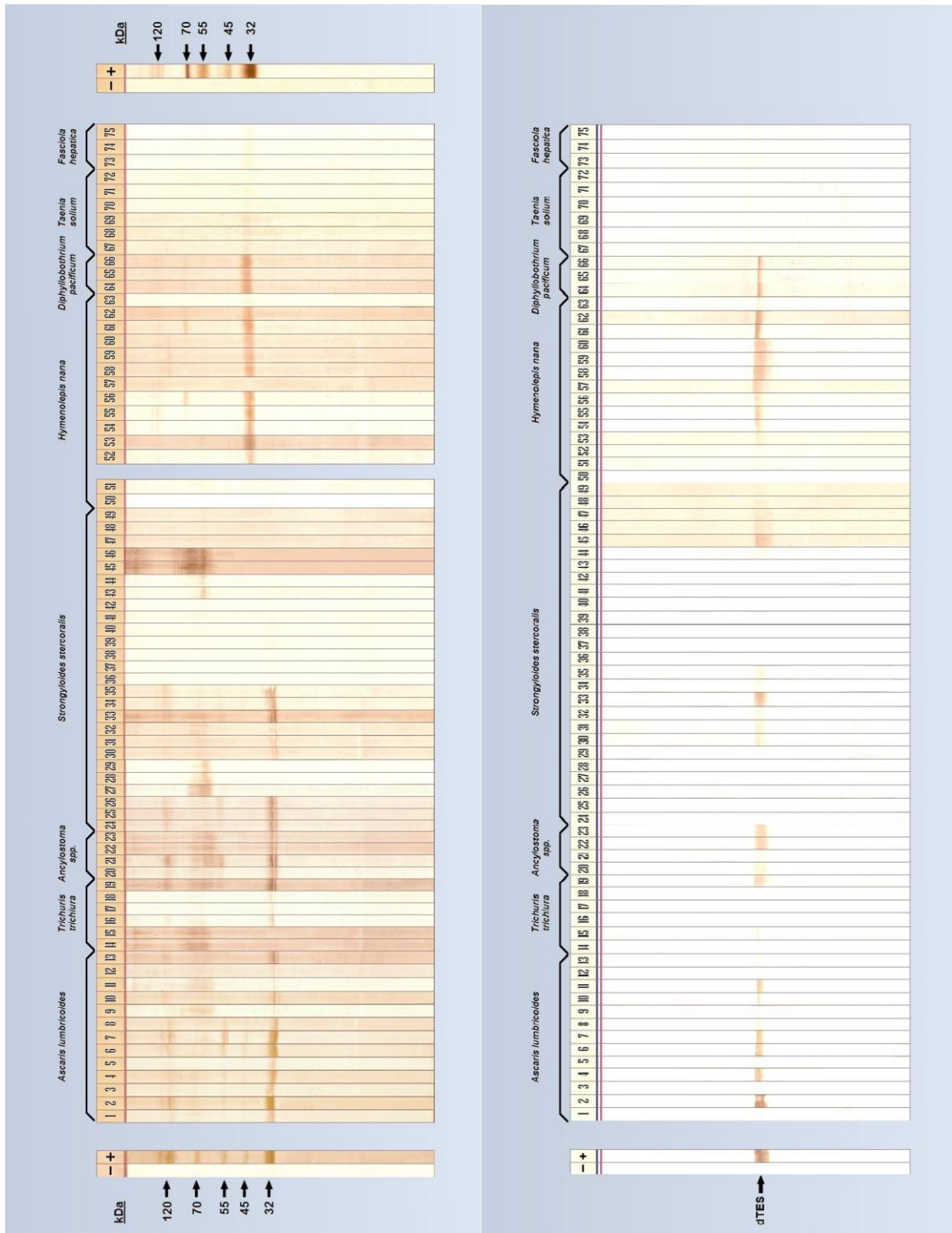
Na avaliação da reatividade dos antígenos dTES contra os soros de pacientes com outras helmintíases, 6 dos 13 pacientes com ascaridíase (46,15%), 1 dos 6 pacientes com trichuríase (16,6%), 3 dos 4 pacientes com ancilostomíase (75%), 9 dos 26 pacientes com estrongiloidíase (34,6%), 11 dos 14 pacientes com himenolepíase (78,6%), e todos os 3 pacientes com difilobotríase (100%) apresentaram reatividade cruzada, obtendo-se uma reatividade total de 44% (33/75) (Figura 22 - direita).



**Figura 20.** Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.



**Figura 21.** Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.



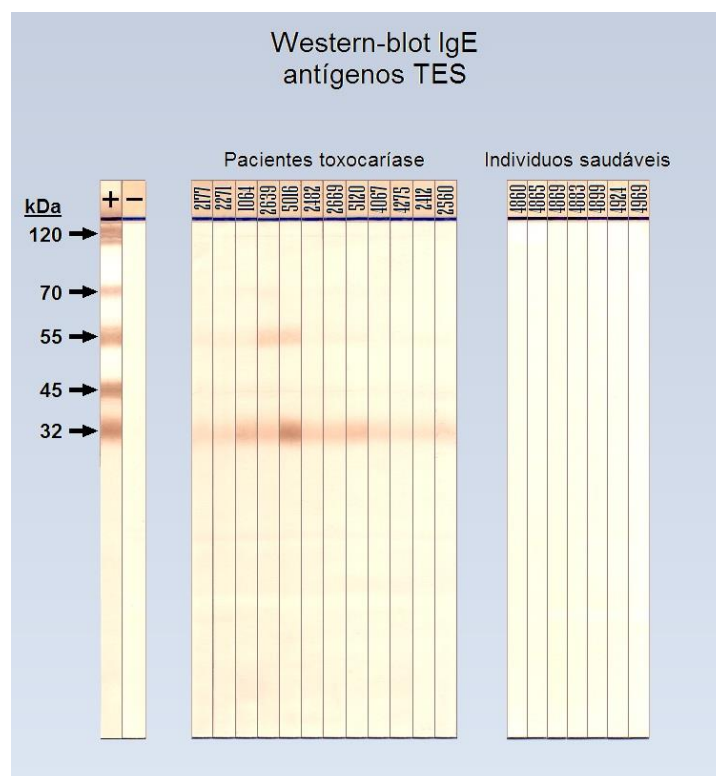
**Figura 22.** Reatividade de anticorpos IgM pelo Western-blotting frente os antígenos TES (esquerda) e os antígenos dTES (direita), em soros de pacientes infectados com *Ascaris lumbricoides* (n = 13), *Trichuris trichiura* (n = 6), *Ancylostoma spp* (n = 4), *Strongyloides stercoralis* (n = 26), *Hymenolepis nana* (n = 14), *Diphyllobothrium pacificum* (n = 3), cisticercose por *Taenia solium* (n = 6) e *Fasciola hepatica* (n = 3), diluídos a 1/50.



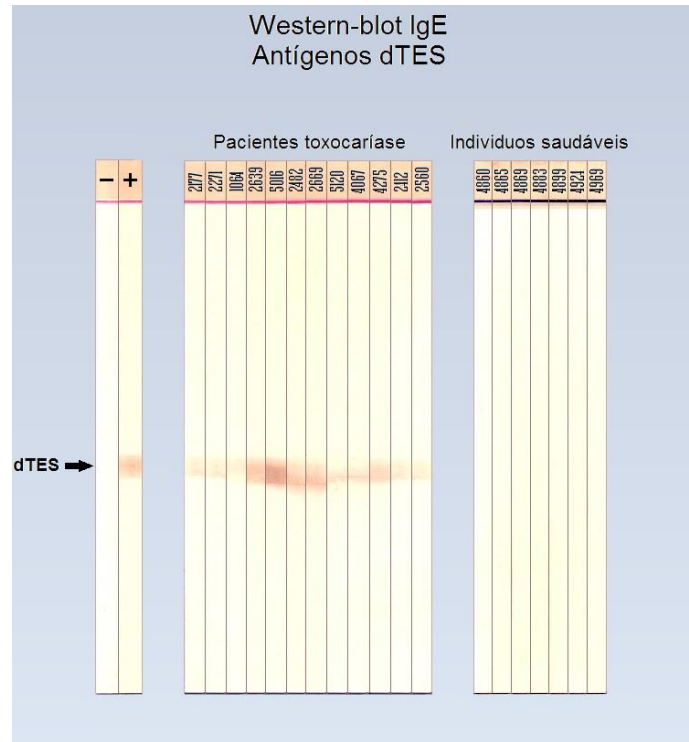
### 4.3.3 WB-IgE

Dos soros de pacientes com toxocaríase, 74,13%(43/58) reagiram contra a fração de 32 kDa, 31% (18/58) reagiram contra a fração de 55 kDa e 3,45%(2/58) reagiram contra a fração de 70 kDa dos antígenos TES. Em relação aos antígenos dTES, estes mesmos 43 soros apresentaram reatividade contra a única fração de 26 kDa, obtendo-se uma sensibilidade de 74,13% para ambos os antígenos. Por outro lado, nenhum dos 95 soros de indivíduos saudáveis apresentaram reatividade contra as cinco frações dos antígenos TES, ou com a fração de 26 kDa dos antígenos dTES, obtendo-se uma especificidade de 100% para ambos os antígenos (Figura 24).

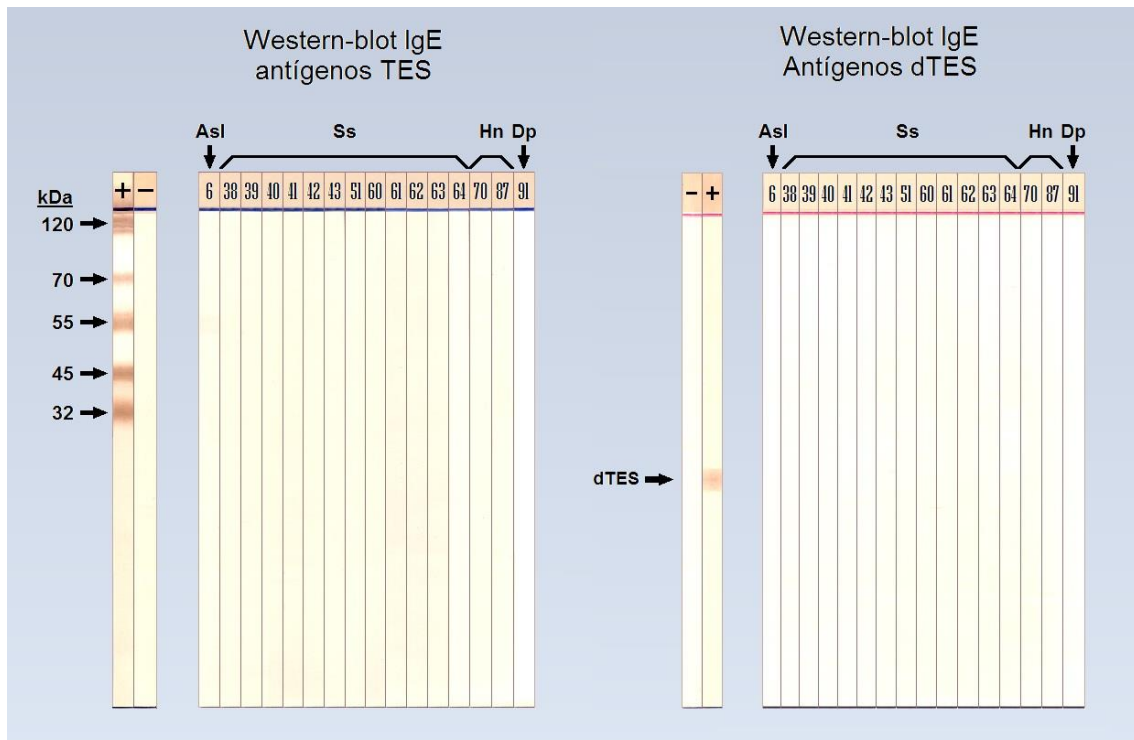
Em relação às outras helmintíases, apenas um paciente com ascaridíase apresentou reatividade fraca contra a fração de 55 kDa (Figura 25 -esquerda), sendo que os demais não apresentaram reatividade contra as frações dos antígenos TES. Por outro lado, nenhum dos pacientes com outras helmintíases apresentou reatividade contra os antígenos dTES (Figura 25 - direita).



**Figura 23.** Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos TES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.



**Figura 24.** Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos dTES, em soros de pacientes com toxocaríase e indivíduos aparentemente saudáveis, diluídos a 1/50.

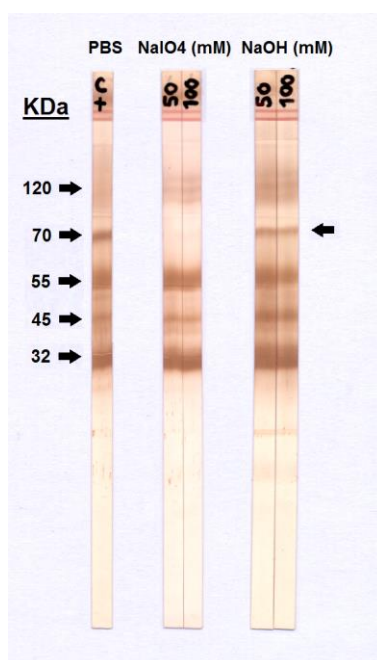


**Figura 25.** Reatividade de anticorpos IgE pelo Western-blotting frente aos antígenos TES (esquerda) e dTES (direita), em soros de pacientes infectados com outras helmintíases e que apresentaram reatividade no teste ELISA: *Ascaris lumbricoides* (Asl), *Strongyloides stercoralis* (Ss), *Hymenolepis nana* (Hn) e *Diphyllobothrium pacificum* (Dp).



#### 4.4 Deglicosilação “in situ” dos antígenos TES

Com o objetivo de analisar quais das frações dos antígenos TES seriam afetadas pelo tratamento com NaOH ou NaIO<sub>4</sub>, um tratamento “in situ” foi realizado em fitas de nitrocelulose contendo os antígenos TES. Sob essas condições, nenhuma das frações dos antígenos TES foi afetada quando foram tratados com NaOH às concentrações finais de 50 e 100mM por 4 horas a 37°C, havendo manutenção da reatividade dos anticorpos IgG contra todas as frações e incremento da reatividade contra a fração de 120 kDa (Figura 26). Por outro lado, quando os antígenos TES foram tratados com NaIO<sub>4</sub> às concentrações finais de 50 e 100mM por 4 horas a 37°C, a reatividade dos anticorpos IgG contra a fração de 70 kDa desapareceu completamente sugerindo que os epítomos que reagem com este tipo de antígeno são de natureza glicosídica (Figura 26).

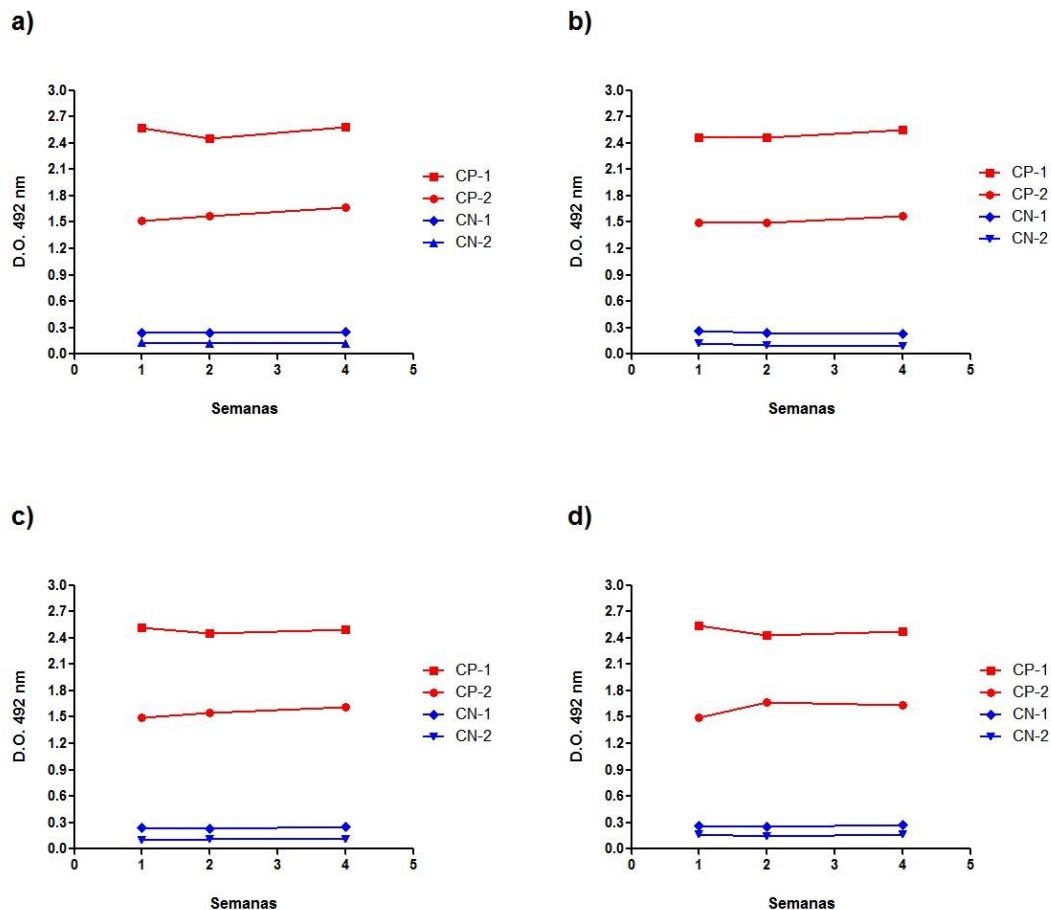


**Figura 26.** Reatividade dos anticorpos IgG pelo Western-blotting, em soros de pacientes com toxocaríase (pool de soros diluído a 1/50) contra os antígenos TES que foram tratados previamente “in situ” com metaperiodato de sódio (NaIO<sub>4</sub>) e hidróxido de sódio (NaOH) às concentrações finais de 50 e 100mM durante 4 horas a 37°C. Utilizou-se PBS como controle do tratamento (C). As massas moleculares das principais frações dos antígenos TES estão expressas em kDa.

#### 4.5 Estabilidade dos antígenos TES deglicosilados

O estudo comparativo das diferentes condições de temperatura de armazenamento dos antígenos mostrou que não houve diferenças significantes na detecção de anticorpos IgG no pool de soros de pacientes com toxocaríase

com alta reatividade (CP1) durante a primeira semana ( $p = 0,642$ ), segunda semana ( $p = 0,588$ ) ou quarta semana ( $p = 0,669$ ). Do mesmo modo ocorreu com o pool de soros de pacientes com toxocaríase com reatividade intermediária (CP2) na primeira semana ( $p = 0,490$ ), segunda semana ( $p = 0,060$ ) ou na quarta semana ( $p = 0,298$ ). No caso dos controlos negativos, não houve diferenças significantes na reatividade, se comparado ao armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , no pool CN1 (próxima ao valor do limiar de reatividade) durante a primeira semana ( $p = 0,300$ ), segunda semana ( $p = 0,463$ ) ou quarta semana ( $p = 0,053$ ). Do mesmo modo ocorreu com o pool CN2 (abaixo do limiar de reatividade) durante a primeira semana ( $p = 0,060$ ), segunda semana ( $p = 0,074$ ) ou na quarta semana ( $p = 0,100$ ). Estes resultados demonstram que os antígenos dTES mantiveram-se estáveis às diferentes temperaturas durante as 4 semanas avaliadas. (Figura 27).



**Figura 27.** Reatividade dos antígenos dTES armazenados por 4 semanas, às temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$  (a),  $4^{\circ}\text{C}$  (b),  $22^{\circ}\text{C}$  (c) e  $37^{\circ}\text{C}$  (d), frente a um pool de soros de pacientes com toxocaríase com alta reatividade (CP1) e mediana reatividade (CP2), um pool de soros de indivíduos saudáveis com reatividade próxima ao valor limiar (CN1) e abaixo do valor do limiar (CN2), para a detecção de anticorpos IgG pelo teste ELISA. Os ensaios foram feitos em sextuplicata e os valores nos gráficos correspondem às médias dos valores obtidos.

## 5. DISCUSSÃO

A detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp. pelo teste ELISA é de grande auxílio no sorodiagnóstico da toxocaríase humana. No entanto, a sua especificidade é prejudicada em áreas tropicais, onde existe uma alta prevalência de parasitoses e presença de coinfeções com outros helmintos. Este fato pode ser devido à presença de epítomos glicosídicos semelhantes, que estão presentes nos diferentes helmintos que reagem de forma cruzada com anticorpos dos pacientes com toxocaríase, gerando resultados falso-positivos no sorodiagnóstico.

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar se a deglicosilação dos antígenos TES (eliminação ou desnaturação das estruturas glicosídicas das glicoproteínas) poderia melhorar a especificidade na detecção de anticorpos IgG, IgM e IgE no sorodiagnóstico da toxocaríase pelo teste ELISA e, ao mesmo tempo, analisar quais seriam as frações dos antígenos TES que apresentavam epítomos inespecíficos e que reagem em forma cruzada com anticorpos presentes no soro de pacientes com outras helmintíases.

No presente trabalho, optou-se pela deglicosilação química com NaOH e a oxidação com metaperiodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ), por serem mais simples e econômicos se comparados aos outros procedimentos.

A deglicosilação química dos antígenos TES com NaOH mostrou-se dependente da concentração molar, da temperatura e do tempo de exposição, uma vez que à temperatura de 4°C, o NaOH quase não atuou sobre as glicanas dos antígenos TES, mesmo tendo sido utilizadas concentrações de 100 mM (Figura 2). Por outro lado, à temperatura de 56°C, o NaOH exerceu uma ação proteolítica, desnaturando quase todas as estruturas proteicas e eliminando assim os epítomos peptídicos presentes nas frações dos antígenos TES.

À temperatura de 37°C, o NaOH exerceu uma ação mais moderada contra as glicanas dos antígenos TES, eliminando-as de forma mais eficiente. Com o aumento na concentração do NaOH para 100 mM, obteve-se eficiência máxima na deglicosilação (Figura 3).

Além disso, observou-se que as frações de alta e intermediária massa molecular, consideradas inespecíficas por vários autores (Magnaval et al., 1991; Yamasaki et al. 2000; Smith et al., 2009), foram eliminadas. Nestas condições de temperatura, o tempo de exposição dos antígenos TES ao NaOH foi também um fator importante no processo de deglicosilação, já que um tempo de apenas 3 horas não foi suficiente para eliminar todas as glicanas e um tempo prolongado de 24 horas fez com que o NaOH começasse a desnaturar a estrutura proteica das frações de baixa massa molecular, consideradas específicas (Magnaval et al., 1991; Smith et al., 2009) (Figura 4).

Alguns autores fazem uso do NaOH para o preparo de extratos antigênicos, que em concentrações mais elevadas como de 0,15M, exerce um efeito proteolítico (Kanamura et al., 1981; Lissaldo et al., 1994; Machado et al., 2003). Porém, um excesso dos radicais hidroxilas poderia alterar a estrutura das proteínas, fragmentando-as, com possibilidade de perda de epítopos para o reconhecimento dos anticorpos (Davies e Delsignore, 1987).

Diante destes achados, as melhores condições encontradas para a deglicosilação química dos antígenos TES foi o tratamento com NaOH à concentração final de 100mM, por 4 horas e à temperatura de 37°C (Figura 5).

Como produto final do tratamento dos antígenos TES com NaOH, foi obtida uma fração de massa molecular de aproximadamente 26 kDa, concordando com o achado de Page e Maizels (1992), que descreveram um produto deglicosilado de mesma massa molecular, gerado após tratamento da fração de 32 kDa com NaOH. Os ensaios de estabilidade, feitos às diferentes temperaturas já mencionadas e por períodos de até 4 semanas, mostram que este produto é estável, conservando os epítopos imunogênicos para reagir satisfatoriamente com os anticorpos IgG (Figura 27).

Não é possível afirmar se as frações dos antígenos TES foram totalmente degradadas pelo NaOH ou se foram fragmentadas em subunidades de baixa massa molecular, passando a formar a nova fração de 26 kDa. Nesse contexto, Page e Maizels (1992) descreveram que a fração de 120 kDa, quando deglicosilada, possui um núcleo polipeptídico de aproximadamente 15 kDa, dados similares aos obtidos por Gems e Maizels (1996). Em outro estudo, Loukas et al. (2000a) descreveram que a fração de 70 kDa, além de possuir O- e N-glicanas, poderia ser um dímero proteico de 28,4 kDa.

No tratamento dos antígenos TES com NaIO<sub>4</sub> em solução, resultados pouco satisfatórios foram encontrados, obtendo-se frações não muito definidas, se comparadas aos resultados com NaOH (Figura 7), apesar de alguns autores descreverem-no como eficiente na desnaturação de glicoproteínas e outros glicoconjugados (Blakey et al., 1987; Zancopé-Oliveira et al., 1994).

Por outro lado, o tratamento "in situ" dos antígenos TES com NaIO<sub>4</sub> em membranas de nitrocelulose, mostrou resultados mais eficientes, podendo ser observada perda na reatividade dos anticorpos IgG contra as frações de 70 kDa e melhor reconhecimento das frações de 120 kDa, com visualização de um triplete bem definido (Figura 18). Este fato poderia ser explicado pela ação do NaIO<sub>4</sub>, clivando os dióis vicinais presentes principalmente nas O-glicanas. Segundo Khoo et al. (1991) as O-glicanas dos antígenos TES possuem uma estrutura similar ao antígeno do grupo sanguíneo H, porém com duas metilações nos sacarídeos fucose e galactose (não usual em eucariotos), sendo que na fucose as ligações dióis vicinais encontram-se livres, podendo sofrer a

quebra pelo  $\text{NaIO}_4$ . Do mesmo modo, também é possível que o metaperiodato possa clivar as ligações dióis vicinais nas moléculas de manose dos extremos terminais da N-glicana, presentes principalmente nas frações de 32 e 70 kDa (Khoo et al. 1993). Um estudo detalhado através de coloração PAS, bem como o uso de lectinas com especificidade para estes sacarídeos e uso de enzimas do tipo glicosidase poderiam confirmar estas duas hipóteses.

No tratamento “in situ” dos antígenos TES com NaOH, a reatividade dos anticorpos IgG se manteve inalterada contra todas as frações. Possivelmente o NaOH não seja tão eficiente na eliminação “in situ” das glicanas dos antígenos TES, quando estes já se encontram fracionados segundo suas massas moleculares, nas membranas de nitrocelulose. Um estudo detalhado através de coloração PAS nas membranas e o uso de lectinas poderiam confirmar esta hipótese.

A detecção de anticorpos IgG nas amostras de soro de pacientes com toxocaríase e de indivíduos saudáveis pelo teste ELISA mostrou que os níveis de anticorpos detectados com os antígenos TES e dTES foram similares, apresentando sensibilidades e especificidades de 100% (Figuras 8 e 9). Estes achados apontam que a eliminação das glicanas dos antígenos TES não afetou a detecção dos anticorpos específicos IgG anti-*Toxocara* spp.

Muitos autores têm avaliado a sensibilidade e especificidade do teste ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*Toxocara* spp., com valores de sensibilidade que variam de 78,3% (Glickman et al., 1978) a 100% (Elefant et al., 2006; Roldán et al., 2009) e valores de especificidade que variam de 86% (Jacquier et al. 1991) a 97,4% (de Savigny et al., 1979). Estes valores de sensibilidade e especificidade dependem basicamente dos valores do limiar de reatividade calculado e dos critérios utilizados para a sua determinação. Vários autores definiram o valor do limiar de reatividade como a média mais 2 ou 3 desvios padrão das densidades ópticas de amostras de soro controle negativos, soros de uma população aparentemente saudável (com ou sem a inclusão de soros de pacientes com outras patologias), obtendo-se assim diferentes valores que variam de 0,260 (Roldán et al., 2006) a 0,500 (de Savigny et al., 1979; Elefant et al., 2006), ou mais de 0,500 (Lynch et al., 1988). Outros fatores como diferenças nos procedimentos do ensaio imunoenzimático, diluição dos soros, bem como o tipo de população estudada, dificultam a comparação entre os resultados (Smith et al., 2009).

No estudo da reatividade cruzada em soros de pacientes infectados com outras helmintíases, a presença de anticorpos IgG inespecíficos diminuiu consideravelmente quando foram utilizados os antígenos dTES, principalmente nos pacientes com ascaridíase e himenolepiase, melhorando assim a especificidade do teste ELISA (Figura 10).

Em áreas tropicais endêmicas parahelmintíases, a ocorrência de reatividade cruzada pode reduzir a especificidade do teste ELISA, devendo ser consideradas no momento de estabelecer o sorodiagnóstico (Smith et al., 2009). Nesse contexto, Cypess et al. (1977) foram os primeiros a propor a absorção de anticorpos inespecíficos com antígenos totais de *A. lumbricoides* como estratégia para aumentara especificidade do teste. Do mesmo modo, Lynch et al. (1988) propuseram a utilização de um extrato antigênico preparado com diferentes helmintos e protozoários. No entanto, devido à distância filogenética existente entre protozoários e helmintos, outros autores sugerem apenas absorver os anticorpos inespecíficos com extrato alcalino de formas adultas de *A. suum* (Camargo et al., 1992; Nunes et al., 1997; Elefant et al., 2006, Roldán et al., 2009). No presente estudo, a deglicosilação química dos antígenos TES com NaOH removeu os epítomos responsáveis pela reatividade cruzada, melhorando a especificidade do teste ELISA para a detecção específica de anticorpos IgG e dispensando o preparo do extrato antigênico de outros parasitos para absorção das amostras de soro.

Na análise da reatividade cruzada dos anticorpos IgG nos soros de pacientes com outras helmintíases, observou-se que os pacientes com ascaridíase, trichuríase, ancilostomíase, estrombiloidíase e himenolepíase reagiram principalmente com a fração de 70 KDa dos antígenos TES, sugerindo que esta fração poderia ser uma das responsáveis pelos resultados falso-positivos no teste ELISA (Figura 19). Neste contexto, vários autores têm reportado que certas frações de massa molecular intermediária seriam inespecíficas, reagindo principalmente com os nematoides *A. lumbricoides* e *A. suum* (Lynch et al., 1988; Kennedy et al., 1989; Nunes et al., 1997; Roldán et al., 2009; Rubinsky-Elefant et al., 2011).

Na avaliação dos antígenos TES e dTES para a detecção de anticorpos IgG pela técnica de Western-blotting, observou-se que todos os pacientes apresentaram anticorpos IgG contra todas as frações dos antígenos TES e que o processo de deglicosilação dos antígenos não alterou a sensibilidade na detecção deste tipo de anticorpos, como já foi observado pelo teste ELISA.

Nem todas as frações dos antígenos TES resultaram ser específicas, já que se observou reatividade cruzada principalmente com as frações de 70 kDa (38,6%), 55 kDa (32%) e com a fração de 32 kDa (10,6%). A fração de 70 kDa foi reconhecida por todas as amostras de soro de pacientes com ascaridíase, por uma proporção significativa dos pacientes com estrombiloidíase e himenolepíase e minoritariamente pelos pacientes com trichuríase e ancilostomíase, sugerindo que esta fração poderia ser uma das responsáveis pelos resultados falso-positivos no teste ELISA. Algo similar ocorreu com a fração de 55 kDa (Figura 19). No entanto, esta reatividade cruzada foi eliminada quando estes antígenos foram deglicosilados com NaOH, sugerindo

que os epítomos que reagem de forma cruzada poderiam ser de natureza glicosídica.

A ocorrência da reatividade cruzada com as frações de 55 e 70 kDa foram descritas por outros autores (Lynch et al.,1988; Kennedy et al., 1989; Nunes et al.,1997; Roldán et al., 2009), sugerindo que estas frações contêm epítomos similares a outros helmintos, tais como *A. lumbricoides*, *A. suum*, *S. stercoralis* e *H. nana*.

Nesse sentido, alguns autores tem reportado que certos helmintos (incluindo *F. hepática* e *T. canis*) possuem O-glicanas com epítomos glicosídicos semelhantes e que estas estruturas também possuem semelhança aos antígenos TF (Gal $\beta$ 1-3 GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr) ou Tn (GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr), presentes em linhagens de carcinomas malignos associados ao câncer (Casaravilla et al., 2003; Osinaga, 2007).

Por outro lado, também se observou certa reatividade cruzada em alguns pacientes infectados com *T. trichiura* e com *Ancylostoma* spp. contra a fração de 32 kDa, mas esta ocorrência foi eliminada quando os antígenos forma deglicosilados, sugerindo uma vez mais que os epítomos glicosídicos podem ser os responsáveis desta reatividade cruzada.

Os anticorpos IgG são constituídos por quatro subclasses diferentes (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e podem reconhecer tanto epítomos peptídicos quanto glicosídicos. Em um estudo sobre a reatividade das diferentes subclasses de IgG frente a extratos antigênicos solúveis de ovos do parasito *Schistosoma mansoni*, Langley et al. (1994) descreveram que os anticorpos IgG2 reagem exclusivamente com epítomos glicosídicos, enquanto que os anticorpos IgG4 reagem exclusivamente com epítomos peptídicos e as outras subclasses (IgG1 e IgG3) são capazes de reagir contra ambos tipos de epítomos. Na toxocaríase, Watthanakulpanich et al.(2008) descreveram que a detecção dos anticorpos IgG2 apresenta maior sensibilidade, enquanto que a detecção de anticorpos IgG3, maior especificidade. No entanto, Noordin et al (2008) descreveram que os anticorpos IgG4 seriam os mais específicos para o sorodiagnóstico da toxocaríase humana.

A detecção de anticorpos IgM pelo teste ELISA mostrou que este tipo de anticorpo encontra-se presente tanto em pacientes com toxocaríase quanto em indivíduos saudáveis, porém com baixas sensibilidades (39,7% para o TES e 34,5% para o dTES) para ambos os antígenos, respectivamente (Figura 11). Na Figura 12, pode-se observar que a reatividade dos anticorpos IgM diminuiu em ambos grupos quando as glicanas foram eliminados dos antígenos TES, sugerindo que os epítomos glicosídicos constituem uma parte importante para o desenvolvimento e resposta dos anticorpos IgM.Schabussova et al. (2007)



descreveram que os anticorpos IgM reagem com os epítomos O-glicosídicos presentes principalmente na fração de 120 kDa dos antígenos TES.

Segundo Smith (1993), a resposta dos anticorpos IgM pode ser de longa duração na toxocaríase e não seriam úteis como marcador da fase aguda. No entanto, alguns autores descreveram que há uma diminuição dos níveis dos anticorpos IgM após tratamento do paciente, sendo uma ferramenta útil no sorodiagnóstico da toxocaríase (Arango, 1998; Shetty e Aviles, 1999).

Pela análise das curvas ROC, foi possível determinar um valor de limiar de reatividade que apresentasse melhores valores de especificidade, diminuindo assim a ocorrência de reatividade cruzada nos pacientes com outras helmintíases com ambos os antígenos (Figuras 11 e 12).

No estudo da reatividade cruzada dos anticorpos IgM em soros de pacientes infectados com outras helmintíases pelo teste ELISA, encontrou-se que todos eles apresentaram reatividade positiva para os antígenos TES e dTES, mesmo quando foram estabelecidos valores mais altos de limiar de reatividade para cada tipo de antígeno (Figura 13). Estes achados sugerem que existem epítomos de origem glicosídico ou peptídico nos antígenos TES que reagem de forma cruzada com anticorpos IgM presentes em pacientes com outras helmintíases. Nesse sentido, Butterworth et al. (1988) encontraram que os anticorpos IgM podem reagir com epítomos glicosídicos presentes, tanto no ovo quanto no esquistossômulo, do parasito *S. mansoni* e que podem bloquear a resposta imune efetiva.

Na avaliação dos antígenos TES e dTES para detecção de anticorpos IgM pela técnica de Western-blotting, observou-se que a maioria dos soros dos pacientes com toxocaríase apresentaram anticorpos IgM contra todas as frações dos antígenos TES, com uma sensibilidade apenas menor se comparado aos anticorpos IgG, e que o processo de deglicosilação dos antígenos quase não alterou a sensibilidade na detecção deste tipo de anticorpo, diferentemente dos achados pelo teste ELISA. Por outro lado, observou-se que 41% dos soros de indivíduos saudáveis apresentaram anticorpos IgM contra a fração de 32 kDa e 31,6% apresentaram anticorpos IgM contra a fração de 70 kDa, reatividade esta que não foi alterada apesar dos antígenos TES terem sido deglicosilados, sugerindo uma vez mais que os anticorpos IgM são inespecíficos e reconhecem epítomos peptídicos e glicosídicos. Esta reatividade inespecífica no soro de indivíduos saudáveis poderia estar relacionada à presença de anticorpos IgM contra epítomos de estruturas antigênicas semelhantes a outros organismos como bactérias, fungos ou plantas presentes no meio ambiente aos quais o ser humano estivesse constantemente exposto (Reiss et al. 1984; Boes et al. 1998)

Os anticorpos IgM reagiram em 65,3% (49/75) das amostras de soro de pacientes infectados com outras helmintíases, principalmente com as frações de 32 kDa (65,3%), 70 kDa (28%) e 120 kDa (42,6%) dos antígenos TES e com menor proporção nas frações de 45 kDa (5,3%) e 55 kDa (17,3%). A eliminação das glicanas dos antígenos TES diminuiu apenas a ocorrência da reatividade cruzada para 44% (33/75), sobretudo no pacientes com ascaridíase, tricuríase e ancilostomíase. No entanto, a eliminação destas glicanas não alterou a ocorrência de reatividade cruzada nos pacientes com *estrongiloidíase*, *himenolepiíase* e *difilobotríase* (Figura 22). Estes achados sugerem uma possível existência de epítomos peptídicos e glicosídicos em certas frações dos antígenos TES que reagem de forma cruzada com anticorpos IgM presentes nos pacientes com outras helmintíases.

Até o momento, não existem artigos publicados sobre a detecção de anticorpos IgM em pacientes com toxocaríase pelo ELISA ou Western-blotting. No entanto, Smith (1993), sugere que os anticorpos IgM não poderiam ser considerados marcadores da fase aguda já que eles podem ser encontrados na fase crônica da infecção. Em soro de pacientes com outras helmintíases, o presente estudo é pioneiro na descrição da reatividade de anticorpos IgM.

A sensibilidade do teste ELISA-IgE para o antígeno TES foi de 63,8% e para o dTES foi 62,1%. Estes valores são semelhantes aos descritos por Elefant et al. (2006), que obtiveram uma sensibilidade menor (78,3%) se comparada aos anticorpos IgG. No presente trabalho, esta pequena redução da sensibilidade do ELISA utilizando antígenos dTES poderia significar que os epítomos glicosídicos são importantes na reatividade dos anticorpos IgE, como já tinha sido descrito por Smith (1993).

Em relação à especificidade, com ambos os antígenos foi de 100%. No estudo da reatividade cruzada dos anticorpos IgE pelo teste ELISA, em soros de pacientes infectados com outras helmintíases, observou-se que principalmente os pacientes com *estrongiloidíase* e *himenolepiíase* reagiram com ambos os antígenos e que a eliminação das glicanas dos antígenos TES não melhorou a ocorrência de reatividade cruzada nesse grupo de pacientes. Nesse contexto, Magnaval et al. (1992) encontraram que os anticorpos IgE podem ser inespecíficos, reagindo de forma cruzada em pacientes com *estrongiloidíase*, *esquistossomose* e *filariose*.

Na avaliação dos antígenos TES e dTES para detecção de anticorpos IgE pela técnica de Western-blotting, observou-se que aproximadamente dois terços dos pacientes com toxocaríase apresentaram anticorpos IgE contra a fração de 32 kDa e um terço destes mesmos pacientes também apresentaram anticorpos contra a fração de 55 kDa. A eliminação das glicanas dos antígenos TES com NaOH não alterou a sensibilidade da detecção pelo Western-blotting,

obtendo-se uma sensibilidade similar aos antígenos TES, porém maior ao teste ELISA. Este fato pode estar relacionado ao tratamento prévio a que são submetidos estes antígenos, com detergentes e agentes redutores para desnaturá-los, expondo um maior número de epítomos ou às diferenças no tempo de incubação das amostras de soro com os antígenos de estudo (2 horas a 37°C no ELISA x 12 horas à T.A. no Western-blotting).

Quando as amostras dos pacientes com outras helmintíases foram avaliadas frente aos antígenos TES e dTES pelo Western-blotting, a ocorrência de reatividade cruzada observada no teste ELISA foi eliminada, sugerindo que existem epítomos conformacionais na estrutura terciária ou quaternária dos antígenos TES que poderiam ser os responsáveis pela reatividade cruzada observada nas amostras de soro de pacientes com estrogiloidíase e himenolepiase pelo teste ELISA e que foram eliminados durante o tratamento prévio dos antígenos TES e dTES na técnica de Western-blotting (Figura 25).

A reatividade dos anticorpos IgE quase exclusivamente contra a fração de 32 kDa dos antígenos TES sugere a possibilidade desta fração possuir propriedades alergênicas com ativação de eosinófilos. Sugane e Oshima (1983) purificaram e caracterizaram uma fração dos antígenos TES de aparente massa molecular de 35 kDa, com propriedade alergênica, e que era reconhecida pelos anticorpos IgG e IgE.

Todos estes achados demonstram a participação das glicanas dos antígenos TES na reatividade cruzada em amostras de soro dos pacientes com outras helmintíases. Portanto, a eliminação das glicanas utilizando NaOH, poderia melhorar a especificidade do sorodiagnóstico da toxocaríase em áreas tropicais endêmicas para outras parasitoses

Futuros estudos sobre a detecção e avaliação das diferentes subclasses da IgG frente aos antígenos TES e dTES são necessários para melhor avaliação da sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos na toxocaríase humana.

## 6. CONCLUSÕES

- Os antígenos TES foram eficientemente deglicosilados pelo tratamento com hidróxido de sódio,
- Os antígenos TES deglicosilados, nos testes ELISA e Western-blotting, para detecção de anticorpos IgG, apresentaram altos valores de sensibilidade e especificidade, comparáveis aos antígenos TES.
- Os antígenos TES deglicosilados reduziram a ocorrência de reatividade cruzada com outras helmintíases na detecção de anticorpos IgG anti-Toxocara spp. pelos testes ELISA e Western-blotting.
- A ocorrência de reações cruzadas foi maior quando as amostras de soro foram testadas contra os antígenos dTES para pesquisa de anticorpos IgM e IgE. Na pesquisa de anticorpos IgM e IgE, a ocorrência de reatividade cruzada foi maior com a utilização dos antígenos dTES.
- O tratamento dos antígenos TES “in situ” com metaperiodato de sódio permitiu observar que os anticorpos IgG reagem apenas com epítomos.

## 7. REFERÊNCIAS

- Akao N, Kondo K, Yoshimura H. Antigenic analysis of excretory-secretory products of 2nd stage larvae of *Toxocara canis* and the antigen recognition in the course of infection. Jap. J. Parasitol. 1983; 32: 551-558.
- Alcântara-Neves NM, dos Santos AB, Mendonça LR, Figueiredo CA, Pontes-de-Carvalho L. An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae. Exp Parasitol. 2008; 119(3): 349-351.
- Arango CA. Visceral larva migrans and the hypereosinophilia syndrome. South Med J. 1998; 91(9): 882-883.
- Araujo P. Observações pertinentes das primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1972; 14: 83-90.
- Ashwath ML, Robinson DR, Katner HP. A presumptive case of toxocariasis associated with eosinophilic pleural effusion: case report and literature review. Am J Trop Med Hyg. 2004; 71(6): 764.
- Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT, Rockey JH. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physicochemical characterization and antibody recognition. J Parasitol. 1987; 73(3): 593-600.
- Blakey DC, Watson GJ, Knowles PP, Thorpe PE. Effect of chemical deglycosylation of ricin A chain on the in vivo fate and cytotoxic activity of an immune toxin composed of ricin A chain and anti-Thy 1.1 antibody. Cancer Res. 1987; 47(4): 947-952.
- Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. Pediatrics. 1952; 9(1): 7-19.
- Beaver PC. Larva migrans. Exp Parasitol. 1956; 5 (6): 587-621.
- Beaver PC. The nature of visceral larva migrans. J Parasitol. 1969; 55(1): 3-12.
- Behrer MR. Hypereosinophilia with eosinophilic granuloma of the liver associated with *Ascaris* infestation. J Pediatr. 1951; 38 (5): 635-640.
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. J Exp Med. 1998;188(12): 2381-2386.
- Bowman DD, Mika-Grieve M, Grieve RB. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*. Am J Trop Med Hyg. 1987; 36(1): 75-82.

Brunanská M, Dubinský P, Reiterová K. *Toxocara canis*: ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *Int J Parasitol*. 1995; 25(6): 683-690.

Brunanská M. *Toxocara canis* (Nematoda:Ascaridae): the fine structure of the oviduct, oviduct-uterine junction and uterus. *Folia Parasitol (Praha)*. 1997; 44(1): 55-61.

Buijs J, Borsboom G, Renting M, Hilgersom WJ, van Wieringen JC, Jansen G, Neijens J. Relationship between allergic manifestations and *Toxocara* seropositivity: a cross-sectional study among elementary school children. *Eur Respir J*. 1997; 10(7): 1467-1475.

Butterworth A, Dunne D, Fulford A, Capron M, Khalife J, Capron A, Koech D, Ouma J, Sturrock R. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie*. 1988; 70(8): 1053-63.

Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ, da Silva MV, Chieffi PP, de Melo EO. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992; 34(1): 55-60.

Cao Y, Blohm D, Ghadimi BM, Stosiek P, Xing PX, Karsten U. Mucins (MUC1 and MUC3) of gastrointestinal and breast epithelia reveal different and heterogeneous tumor-associated aberrations in glycosylation. *J Histochem Cytochem*. 1997; 45(11): 1547-1557.

Casaravilla C, Freire T, Malgor R, Medeiros A, Osinaga E, Carmona C. Mucin-type O-glycosylation in helminth parasites from major taxonomic groups: evidence for widespread distribution of the Tn antigen (GalNAc-Ser/Thr) and identification of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity. *J Parasitol*. 2003; 89(4): 709-714.

Chieffi PP, Santos SV, Queiroz ML, Lescano SA. Human toxocariasis: contribution by Brazilian researchers. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009;51(6): 301-308.

Cypess RH, Karol MH, Zidian JL, Glickman LT, Gitlin D. Larva-specific antibodies in patients with visceral larva migrans. *J Infect Dis*. 1977; 135(4): 633-640.

Davies KJ, Delsignore ME. Protein damage and degradation by oxygen radicals.III. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem*. 1987; 262(20): 9908-9913.



De Brito T, Chieffi PP, Peres BA, Santos RT, Gayotto LCC, Viana MR, Porta, GP, Alves VAF. Immunohistochemical detection of toxocaral antigens in human liver biopsies. *Int J Surg Pathol.* 1994; 2(2): 117-124.

De Savigny DH, Voller A, Woodruff AW. Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol.* 1979; 32(3): 284-288.

De Visser L, Rothova A, de Boer JH, van Loon AM, Kerkhoff FT, Canninga-van Dijk MR, Weersink AY, de Groot-Mijnes JD. Diagnosis of ocular toxocariasis by establishing intraocular antibody production. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145(2): 369-374.

Del Prete GF, De Carli M, Mastromauro C, Biagiotti R, Macchia D, Falagiani P, Ricci M, Romagnani S. Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest.* 1991; 88(1): 346-350.

Dent JH, Nichols RL, Beaver PC, Carrera GM, Staggers RJ. Visceral larva migrans; with a case report. *Am J Pathol.* 1956; 32(4): 777-803.

Dernouchamps JP, Verougstraete C, Demolder E. Ocular toxocariasis: a presumed case of peripheral granuloma. *Int Ophthalmol.* 1990; 14(5-6): 383-388.

Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16 (2): 265-272.

Duk M, Ugorski M, Lisowska E.  $\beta$ -elimination of O-glycans from glycoprotein transferred to immobilized P membranes: method and some applications. *Anal Biochem.* 1997; 253(1): 98-102.

Edge AS. Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulphonic acid: elucidation of molecular structure and function. *Biochem J.* 2003; 376(2): 339-350.

Elefant GR, Shimizu SH, Sanchez MC, Jacob CM, Ferreira AW. 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 Anal.* 2006; 20(4): 164-172.

Fan CK, Liao CW, Cheng YC. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: genetics and environment. *Vet Parasitol.* 2013; 193(4): 342-352.

Feldman GJ, Parker HW. Visceral larva migrans associated with the hypereosinophilic syndrome and the onset of severe asthma. *Ann Intern Med.* 1992; 116(10): 838-840.

Finsterer J, Auer H. Neurotoxocarosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 2007; 49(5): 279-287.

Fogt-Wyrwas R, Jarosz W, Mizgajska-Wiktor H. Utilizing a polymerase chain reaction method for the detection of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs in soil. *J Helminthol.* 2007; 81(1): 75-78.

Gavignet B, Piarroux R, Aubin F, Millon L, Humbert P. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. *J Am Acad Dermatol.* 2008; 59(6): 1031-1042.

Gems D, Maizels RM. An abundantly expressed mucin-like protein from *Toxocara canis* infective larvae: the precursor of the larval surface coat glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(4): 1665-1670.

Glickman L, Schantz P, Dombroske R, Cypess R. Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Am J Trop Med Hyg.* 1978; 27(3): 492-498.

Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev.* 1981; 3: 230-250.

Glickman LT, Magnaval JF, Domanski LM, Shofer FS, Lauria SS, Gottstein B, Brochier B. Visceral larva migrans in French adults: a new disease syndrome? *Am J Epidemiol.* 1987; 125(6): 1019-1034.

Hancock K, Narang S, Pattabhi S, Yushak ML, Khan A, Lin SC, Plemons R, Betenbaugh MJ, Tsang VC. False positive reactivity of recombinant, diagnostic, glycoproteins produced in High Five insect cells: effect of glycosylation. *J Immunol Methods.* 2008; 330(1-2): 130-136.

Hanisch FG, Teitz S, Schwientek T, Müller S. Chemical de-O-glycosylation of glycoproteins for application in LC-based proteomics. *Proteomics.* 2009; 9(3): 710-719.

Hassan AT, el-Manawaty NH. Experimental murine toxocariasis histopathological study of chronic renal infection, transplacental transmission and ultrastructural study of egg shell. *J Egypt Soc Parasitol.* 1994; 24(2): 333-339.

Hill IR, Denham DA, Scholtz CL. *Toxocara canis* larvae in the brain of a British child. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79(3): 351-354.

Hong JC, Kim YS. Alkali-catalyzed beta-elimination of periodate-oxidized glycans: a novel method of chemical deglycosylation of mucin gene products in paraffin embedded sections. *Glycoconj J*. 2000; 17(10): 691-703.

Iglesias R, Leiro J, Ubeira FM, Santa Marina MT, Navarrete I, San Martín ML. Antigenic cross-reactivity in mice between third-stage larvae of *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol Res*. 1996;82(4):378-381.

Inoue K, Inoue Y, Arai T, Nawa Y, Kashiwa Y, Yamamoto S, Sakatani M. Chronic eosinophilic pneumonia due to visceral larva migrans. *Intern Med*. 2002; 41(6): 478-482.

Ishida MM, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, Hoshino-Shimizu S, Vaz AJ. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop*. 2003; 89(1): 73-84.

Jacob CM, Pastorino AC, Peres BA, Mello EO, Okay Y, Oselka GW. Clinical and laboratorial features of visceral toxocariasis in infancy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994; 36(1): 19-26.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J. Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol*. 1991; 29(9): 1831-1835.

Kanamura HY, Hoshino-Shimizu S, da Silva LC. Solubilization of antigens of *S. mansoni* adult worms for the passive hemagglutination test. Preliminary reports. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1981; 23(2): 92-95.

Kayes SG, Oaks JA. *Toxocara canis*: T lymphocyte function in murine visceral larva migrans and eosinophilia onset. *Exp Parasitol*. 1980; 49(1):47-55.

Kayes SG. Human toxocariasis and the visceral larva migrans syndrome: correlative immunopathology. *Chem Immunol*. 1997; 66: 99-124.

Kennedy MW, Qureshi F, Fraser EM, Haswell-Elkins MR, Elkins DB, Smith HV. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, and *Toxocara canis*. *Clin Exp Immunol*. 1989; 75(3): 493-500.

Khalil HM, Azab ME, Safar EH, Bebars MA, el-Hady HM, Khattab HM. Immunodiagnosics of visceral toxocariasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1989; 19(2): 381-393.

Khoo KH, Maizels RM, Page AP, Taylor GW, Rendell NB, Dell A. Characterization of nematode glycoproteins: the major O-glycans of *Toxocara*

excretory-secretory antigens are O-methylated trisaccharides. *Glycobiology*. 1991; 1(2): 163-171.

Khoo, KH, Morris HR, Dell A. 1993. Structural characterization of the major glycans of *Toxocara canis* ES antigens. In: Lewis J, Maizels RM. (Eds.), *Toxocara and Toxocariasis: Clinical, Epidemiological and Molecular Perspectives*. Institute of Biology, London, pp. 133-140.

Kim YH, Huh S, Chung YB. Seroprevalence of toxocariasis among healthy people with eosinophilia. *Korean J Parasitol*. 2008; 46(1): 29-32.

Kraus A, Valencia X, Cabral AR, de la Vega G. Visceral larva migrans mimicking rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 1995; 22(3): 497-500.

Kwon NH, Oh MJ, Lee SP, Lee BJ, Choi DC. The prevalence and diagnostic value of toxocariasis in unknown eosinophilia. *Ann Hematol*. 2006; 85(4): 233-238.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-685.

Langenbucher J, Labouvie E, Morgenstern J. Measuring diagnostic agreement. *J Consult Clin Psychol*. 1996; 64(6): 1285-1289.

Langley JG, Kariuki HC, Hammersley AP, Ouma JH, Butterworth AE, Dunne DW. Human IgG subclass responses and subclass restriction to *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Immunology*. 1994; 83(4): 651-658.

Le Luyer B, Menager V, Audebert C, Le Roux P, Briquet MT, Boulloche J. [Inflammatory joint disease as a manifestation of *Toxocara canis* larva migrans]. *Ann Pediatr (Paris)*. 1990; 37(7): 445-448.

Li MW, Lin RQ, Chen HH, Sani RA, Song HQ, Zhu XQ. PCR tools for the verification of the specific identity of ascaridoid nematodes from dogs and cats. *Mol Cell Probes*. 2007; 21(5-6): 349-354.

Lissaldo AM, Hoshino-Shimizu S, Umezawa ES, Stolf AM. Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to Dot-ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1994; 36(2): 163-166.

Lorenzo S, Romarís F, Iglesias R, Audicana MT, Alonso JM, Leiro J, Ubeira FM. O-glycans as a source of cross-reactivity in determinations of human serum antibodies to *Anisakis simplex* antigens. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30(4): 551-559.

Loukas A, Doedens A, Hintz M, Maizels RM. Identification of a new C-type lectin, TES-70, secreted by infective larvae of *Toxocara canis*, which binds to host ligands. *Parasitology*. 2000a; 121 (5):545-554.

Loukas A, Hintz M, Linder D, Mullin NP, Parkinson J, Tetteh KK, Maizels RM. A family of secreted mucins from the parasitic nematode *Toxocara canis* bears diverse mucin domains but shares similar flanking six-cysteine repeat motifs. *J Biol Chem*. 2000b; 275(50): 39600-39607.

Lozano MJ, Martín HL, Díaz SV, Mañas AI, Valero LA, Campos BM. Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite*. 2004;11(2):219-23.

Lynch NR, Wilkes LK, Hodgen AN, Turner KJ. Specificity of *Toxocara* ELISA in tropical populations. *Parasite Immunol*. 1988; 10(3): 323-37.

Machado ER, Ueta MT, de Fátima Gonçalves-Pires Mdo R, Alves de Oliveira JB, Faccioli LH, Costa-Cruz JM. *Strongyloides venezuelensis* alkaline extract for the diagnosis of human strongyloidiasis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98(6): 849-851.

MagnaVal JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrard B. Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol Res*. 1991; 77(8): 697-702.

MagnaVal JF, Fabre R, Maurières P, Charlet JP, de Larrard B. Evaluation of an immunoenzymatic assay detecting specific anti-*Toxocara* immunoglobulin E for diagnosis and post treatment follow-up of human toxocariasis. *J Clin Microbiol*. 1992; 30(9): 2269-2274.

MagnaVal JF, Glickman LT, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human toxocariasis. *Korean J Parasitol*. 2001; 39 (1):1-11.

Maizels RM, de Savigny D, Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Immunol*. 1984; 6(1):23-37.

Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, Selkirk ME. *Parasite Antigens, Parasite Genes: A laboratory manual for molecular parasitology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. pp. 30-34.

Maizels RM. *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol*. 2013; 193(4): 365-374.

Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol*. 2010; 6(10): 713-723.

Maruyama H, Nawa Y, Noda S, Mimori T, Choi WY. An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyushu, Japan. *Lancet*. 1996; 347(9017): 1766-1767.

Mercer RD, Lund HZ, Bloomfield RA, Caldwell FE. Larval ascariasis as a cause of chronic eosinophilia with visceral manifestations. *Am J Dis Child*. 1950; 80(1): 46-58.

Musso C, Castelo JS, Tsanaclis AM, Pereira FE. Prevalence of *Toxocara* induced liver granulomas, detected by immunohistochemistry, in a series of autopsies at a Children's Reference Hospital in Vitória, ES, Brazil. *Virchows Arch*. 2007; 450(4): 411-447.

NCBI taxonomy database [cited 2013 Oct 14]. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Infoeid=6264&lvl=3&ep=mapview&ep=has\\_linkout&ep=blast\\_urlep=genome\\_blast&lin=fekeep=1&srchmode=1&unlock](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Infoeid=6264&lvl=3&ep=mapview&ep=has_linkout&ep=blast_urlep=genome_blast&lin=fekeep=1&srchmode=1&unlock)

Nichols RL. The etiology of visceral larva migrans. I. Diagnostic morphology of infective second-stage *Toxocara* larvae. *J Parasitol*. 1956; 42(4): 349-362.

Nielsen BL, Brown LR. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1984; 141(2): 311-315.

Noordin R, Smith HV, Mohamad S, Maizels RM, Fong MY. Comparison of IgG-ELISA and IgG4-ELISA for *Toxocara* serodiagnosis. *Acta Trop*. 2005; 93(1): 57-62.

Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997; 39(5): 253-256.

Ogata S, Lloyd KO. Mild alkaline borohydride treatment of glycoproteins—a method for liberating both N- and O-linked carbohydrate chains. *Anal Biochem*. 1982; 119(2): 351-359.

Omar HM, Barriga OO. Biology and pathophysiology of *Toxocara vitulorum* infections in a rabbit model. *Vet Parasitol*. 1991; 40(3-4): 257-266.

Osinaga E. Expression of cancer-associated simple mucin-type O-glycosylated antigens in parasites. *IUBMB Life*. 2007; 59(4-5): 269-273.

Overgaauw PA, van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol*. 2013; 193(4): 398-403.

Page AP, Maizels RM. Biosynthesis and glycosylation of serine/threonine-rich secreted proteins from *Toxocara canis* larvae. *Parasitology*. 1992; 105 (2):297-308.

Pawlowski Z. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J Helminthol*. 2001; 75(4): 299-305.

Perlingiero JG, Gyorgy P. Chronic eosinophilia; report of a case with necrosis of the liver, pulmonary infiltrations, anemia and ascaris infestation. *Am J Dis Child*. 1947 Jan;73(1):34-43.

Perteguer MJ, Aguila C, Fenoy S, Guillén JL, Cuéllar C. Cross-reactivity induced by *Anisakis simplex* and *Toxocara canis* in mice. *J Helminthol*. 2003; 77(4): 331-334.

Ponce-Macotela M, Rodríguez-Caballero A, Peralta-Abarca GE, Martínez-Gordillo MN. A simplified method for hatching and isolating *Toxocara canis* larvae to facilitate excretory-secretory antigen collection in vitro. *Vet Parasitol*. 2011; 175(3-4):382-385.

Prociv P, Brindley PJ. Oral, parenteral and paratenic infections of mice with *Toxocara pteropodis*. *Int J Parasitol*. 1986; 16(5):471-474.

Reiss E, Cherniak R, Eby R, Kaufman L. Enzyme immunoassay detection of IgM to galactoxylomannan of *Cryptococcus neoformans*. *Diagn Immunol*. 1984;2(2):109-115.

Restrepo BI, Obregón-Henao A, Mesa M, Gil DL, Ortiz BL, Mejía JS, Villota GE, Sanzón F, Teale JM. Characterisation of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Int J Parasitol*. 2000; 30(6): 689-96.

Robertson BD, Bianco AT, McKerrow JH, Maizels RM. *Toxocara canis*: proteolytic enzymes secreted by the infective larvae in vitro. *Exp Parasitol*. 1989; 69(1):30-36.

Roig J, Romeu J, Riera C, Texido A, Domingo C, Morera J. Acute eosinophilic pneumonia due to toxocariasis with bronchoalveolar lavage findings. *Chest*. 1992; 102(1): 294-96.

Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(1):71-74.

Roldán WH, Espinoza YA, Huapaya PE, Huiza AF, Sevilla CR, Jiménez S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Peru

determined by DOT-ELISA test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009; 51(2): 67-71.

Roldán WH, Espinoza YA. Evaluation of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test for the confirmatory serodiagnosis of human toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(3): 411-418.

Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, Díaz P, Díez-Baños P, Morrondo P, Paz-Silva A. Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assays-analysis of cross-reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*. Immunol Invest. 2003; 32(3): 131-142.

Roth Z, Yehezkel G, Khalaila I. Identification and quantification of protein glycosylation. Int J Carbohydr Chem. 2012; Art ID 640923, 10 pp.

Rubinsky-Elefant, G.; Jacob, C.M.A.; Kanashiro, E.H.; Peres, B.A. Toxocaríase. In: Ferreira, A.W.; Ávila, S.L.M. (edit.). Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 3ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2013, p. 351-362.

Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. Ann Trop Med Parasitol. 2010; 104(1): 3-23.

Rubinsky-Elefant G, Hoshino-Shimizu S, Jacob CM, Sanchez MC, Ferreira AW. Potential immunological markers for diagnosis and therapeutic assessment of toxocariasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011; 53(2): 61-65.

Sakakibara A, Baba K, Niwa S, Yagi T, Wakayama H, Yoshida K, Kobayashi T, Yokoi T, Hara K, Itoh M, Kimura E. Visceral larva migrans due to *Ascaris suum* which presented with eosinophilic pneumonia and multiple intra-hepatic lesions with severe eosinophil infiltration--outbreak in a Japanese area other than Kyushu. Intern Med. 2002; 41(7): 574-579.

Savigny DH. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. J Parasitol. 1975; 61(4):781-782.

Schabussova I, Amer H, van Die I, Kosma P, Maizels RM. O-methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. Int J Parasitol. 2007; 37(1): 97-109.

Schantz PM, Glickman LT. Toxocaral visceral larva migrans. N Engl J Med. 1978; 298(8): 436-439.



Schantz PM. *Toxocara larva migrans* now. Am J Trop Med Hyg. 1989; 41(3 Suppl): 21-34.

Shetty AK, Aviles DH. Nephrotic syndrome associated with *Toxocara canis* infection. Ann Trop Paediatr. 1999 Sep;19(3):297-300.

Skerrett H, Holland CV. Variation in the larval recovery of *Toxocara canis* from the murine brain: implications for behavioural studies. J Helminthol. 1997; 71(3): 253-5.

Smith HV, Kusel JR, Girdwood RW. The production of human A and B blood group like substances by in vitro maintained second stage *Toxocara canis* larvae: their presence on the outer larval surfaces and in their excretions/secretions. Clin Exp Immunol. 1983;54(3):625-33.

Smith, H.V. Antibody reactivity in toxocariasis. In: *Toxocara* and toxocariasis: clinical, epidemiological and molecular perspectives. 1993. Chapter 10. pp. 91-109.

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

Speiser F, Gottstein B. A collaborative study on larval excretory/secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. Acta Trop. 1984;41(4):361-72.

Spiro RG. Periodate oxidation of the glycoprotein fetuin. J Biol Chem. 1964;239: 567-573.

Sprent JF. Observations on the development of *Toxocara canis* (Werner, 1782) in the dog. Parasitology. 1958; 48(1-2): 184-209.

Sprent JFA. Visceral Larva Migrans. Aust J Biol Sci. 1963; 25: 344-354.

Strube C, Heuer L, Janecek E. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. VetParasitol. 2013;193(4):375-389.

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

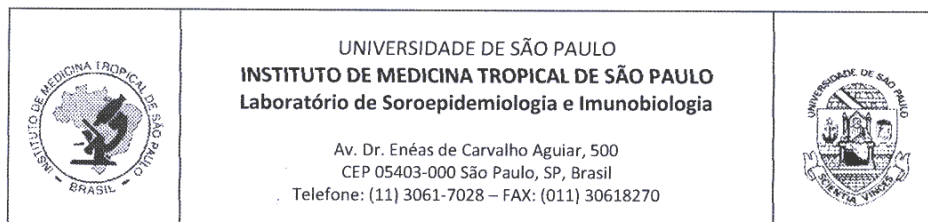
Sugane K, Oshima T. Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. J Helminthol. 1984; 58(2): 143-147.

Taylor MR, Keane CT, O'Connor P, Girdwood RW, Smith H. Clinical features of covert toxocariasis. Scand J Infect Dis. 1987; 19(6): 693-696.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(9): 4350-4354.
- Uga S, Matsuo J, Kimura D, Rai SK, Koshino Y, Igarashi K. Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Vet Parasitol*. 2000; 92(4): 287-294.
- Vidal JE, Sztajn bok J, Seguro AC. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 69(3): 341-343.
- Warren EG. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. *Int J Parasitol*. 1971; 1(1): 85-99.
- Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D. Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies(IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Trop*. 2008; 106(2): 90-95.
- Watthanakulpanich D. Diagnostic trends of human toxocariasis. *J Trop Med & Parasitol*. 2010; 33(1): 44-52.
- Wilder HC. Nematode endophthalmitis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1950; 55: 99-109.
- Wolfrom E, Chêne G, Boisseau H, Beylot C, Géniaux M, Taïeb A. Chronic urticaria and *Toxocara canis*. *Lancet*. 1995; 345(8943): 196.
- Yamasaki H, Araki K, Lim PK, Zasmy N, Mak JW, Taib R, Aoki T. Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(4): 1409-1413.
- Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, O uji Y, Ishizaka S, Kasahara K, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyama H, Akao N. A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int*. 2008; 57(4):525-529.
- Zou KH, O'Malley AJ, Mauri L. Receiver-operating characteristic analysis for evaluating diagnostic tests and predictive models. *Circulation*. 2007; 115(5): 654-657.
- Zhu XQ, Gasser RB, Chilton NB, Jacobs DE. Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *J Helminthol*. 2001; 75 (2): 101-108.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot method. Clin Diagn Lab Immunol.1994; 1(4): 390-393.

## Anexo nº 1



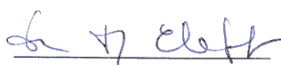
### **TERMO DE ANUÊNCIA SOBRE USO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS ARMAZENADAS NO LABORATÓRIO DE SEROEPIDEMIOLOGIA E IMUNOBIOLOGIA DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO**

À Comissão de Ética e Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias

Prezados Senhores,

Declaro para os devidos fins que o aluno do programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da USP, WILLIAM HENRY ROLDAN GONZALES (Nº USP 8100802), responsável pelo projeto “Deglicosilação dos antígenos de excreção-secreção de *Toxocara canis* e a sua aplicação no sorodiagnóstico da toxocaríase humana”, possui autorização para o uso de amostras de soros armazenadas no Laboratório de Seroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, sob minha responsabilidade. Estes soros já foram utilizados anteriormente para a detecção de anticorpos anti-*Toxocara* spp. pelo teste imunoenzimático ELISA. No presente trabalho, estes soros serão utilizados para os mesmos fins, declarando que a identidade dos sujeitos da pesquisa não será revelada.

Atenciosamente,



Dra. Guita Rubinsky Elefant  
Laboratório de Seroepidemiologia e  
Imunobiologia - IMTSP

Dra. Guita Rubinsky Elefant  
Lab. de Seroepidemiologia  
IMT-USP  
CRF- 11255

## **Anexo nº 2**



## **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **12/12/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **402/12** intitulado: “**DEGLICOSILAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO-SECREÇÃO DE TOXOCARA CANIS E A SUA APLICAÇÃO NO SORODIAGNÓSTICO DA TOXOCARIÁSE HUMANA**” apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **ANTONIO WALTER FERREIRA**

Pesquisador (a) Executante: **WILLIAM HENRY ROLDÁN GONZÁLES**

**CEP-FMUSP, 14 de Dezembro de 2012.**

**Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori**  
**Vice-Coordenador**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**