

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ANTÍGENOS DE *TOXOCARA VITULORUM* POR
SDS-PAGE E “WESTERN BLOT”**

FABIANO PAN FERREIRA

ILHA SOLTEIRA/SP

2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ANTÍGENOS DE *TOXOCARA VITULORUM* POR
SDS-PAGE E “WESTERN BLOT”**

AUTOR: FABIANO PAN FERREIRA

ORIENTADORA: Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP/Câmpus de Ilha Solteira, para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia - Área de Concentração: Sistema de Produção Animal.

ILHA SOLTEIRA – SP

Julho de 2002

Dedico

A minha mãe sempre...

AGRADECIMENTOS

- A orientadora Profa. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti, pela paciência, atenção e sobretudo pela confiança e incentivo durante os dois anos de curso. Agradeço pelos preciosos ensinamentos, dando-me exemplos de dedicação e inspiração à pesquisa. Fica guardado o exemplo de profissional e de pessoa. A você, o meu respeito e admiração!
- A coordenação do curso de Pós-graduação do Departamento de Biologia e Zootecnia do Câmpus de Ilha Solteira da FEIS/UNESP, por ter me proporcionado a oportunidade de avançar nos conhecimentos.
- Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia, João Augusto da Paixão e Aparecida Duarte Cardoso, pela valiosa dedicação e auxílio na pesquisa.
- Aos funcionários do Setor da Bovinocultura da Fazenda de Ensino e Pesquisa - UNESP, pelo manejo e coleta de material, os quais foram necessários para a realização deste experimento.
- A FAPESP pela concessão da Bolsa de Estudos e financiamento da pesquisa.
- Aos Professores, Dr. Edson Guilherme Vieira e Dra Maria Conceição Zocoller Seno, pela paciência e atenção ao nosso trabalho, bem como pelas suas avaliações e valiosas sugestões.
- Aos amigos: Antonio Carlos Noronha-Júnior, Silvia Helena de Paula Lemos, Eronides Marques de Souza e Maria Francisca Neves pelo companheirismo, união, auxílio e dicas nessa jornada.
- Às secretárias, Meiri Sayuri Cruz e Zeneide Ribeiro Campos, por suas atenções a nós pós-graduandos e pelos serviços prestados.
- A Sra. Creuza Nozela Beltrano, zeladora do Departamento de Biologia e Zootecnia, por sua alegria e boa disposição diária.
- Aos colegas do curso de Pós-graduação pelos momentos que passamos juntos.
- A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização e conclusão deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	3
1. Importância do parasitismo por <i>T. vitulorum</i>	3
2. Resposta imune dos búfalos frente ao parasitismo por <i>Toxocara</i>	5
3. Caracterização antigênica dos antígenos de <i>Toxocara</i>	7
4. Reação cruzada.....	9
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1. Local.....	12
2. Animais e manejo.....	12
3. Obtenção e preparação do antígeno de <i>T. vitulorum</i>	12
4. Quantificação da proteína.....	15
5. Conservação do antígeno	15
6. Amostras de material	16
7. Caracterização e análise dos antígenos	21
8. Delineamento experimental.....	24
RESULTADOS	25
1. Parâmetros parasitológicos.....	25
2. SDS-PAGE.....	28
3. “Western blot”	32

DISCUSSÃO	39
1. Parâmetros parasitológicos.....	39
2. Caracterização antigênica por SDS-PAGE.....	40
3. Caracterização antigênica pelo WB de soro e colostro de búfalas adultas no dia do parto.....	41
4. Caracterização antigênica pelo WB de soros imunes de bezerros búfalos naturalmente infectados por <i>T. vitulorum</i> em diferentes fases.....	42
5. Especificidade antigênica.....	44
CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Bezerros búfalos naturalmente infectados por <i>T. vitulorum</i> nascidos no ano de 1999 segundo OPG e absorbância pelo método ELISA indireto, Ilha Solteira - SP, 2002.....	18
TABELA 2 - Separação das frações antigênicas em eletroforese	24
TABELA 3 - WB dos soros obtidos de camundongos imunizados contra antígenos Ex, ES e Pe	24
TABELA 4 - WB dos soros obtidos de bezerros búfalos naturalmente infectados em diferentes faixas etárias.....	24
TABELA 5 – WB de soro e colostro obtidos de búfalas adultas no dia do parto	24
TABELA 6 – Número de ovos de <i>T. vitulorum</i> por grama de fezes de bezerros búfalos naturalmente infectados segundo a idade, número de animais analisados e amplitude de variação, com idades de 1 a 192 dias, Ilha Solteira – SP, 2002.....	26
TABELA 7 – Caracterização dos antígenos Pe, Ex e ES pelo SDS-PAGE e análise pelo WB.....	34
TABELA 8 – Caracterização dos antígenos Pe, Ex e ES pelo SDS-PAGE e análise pelo WB de soros imunes de camundongos imunizados experimentalmente.....	35

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Número de ovos de <i>Toxocara vitulorum</i> por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos nascidos no ano de 1999, segundo a idade.....	27
FIGURA 2 – Mobilidade relativa do antígeno Pe em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie	29
FIGURA 3 – SDS-PAGE a 12% do antígeno Pe de <i>T. vitulorum</i> revelando pesos moleculares de 11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 41,1 µg. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671).....	29
FIGURA 4 – Mobilidade relativa do antígeno Ex em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie	30
FIGURA 5 – SDS-PAGE a 12% do antígeno Ex de <i>T. vitulorum</i> revelando pesos moleculares de 11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82 e 96 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 109,6 µg. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671).....	30
FIGURA 6 – Mobilidade relativa do antígeno ES em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie	31

- FIGURA 7 – SDS-PAGE a 12% do antígeno ES de *T. vitulorum* revelando pesos moleculares de 190, 150, 110, 90, 64, 56, 48 e 19 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 54 µg. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671)..... 31
- FIGURA 8 – Análise pelo WB do (1) “pool” dos soros de búfalas adultas no dia do parto (referência positiva) e (2) “pool” de soros de bezerros búfalos com um dia pós-parto antes de receberem o colostro (referência negativa). (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) Antígeno Ex (109,6 µg) e (c) Antígeno ES (54 µg)..... 36
- FIGURA 9 – Análise pelo WB do (1) “pool” de colostro de búfalas no dia do parto e “pool” de soros imunes de bezerros búfalos: (2) com um dia de idade após receberem o colostro, (3) aparecimento e ascensão, (4) pico, (5) declínio e (6) ausência. (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) antígeno Ex (109,6 µg) e (C) antígeno ES (54 µg)..... 37
- FIGURA 10 – Análise pelo WB do “pool” de soros imunes de camundongos de quatro grupos distintos: (1) controle, (2) anti-Pe, (3) anti-Ex e (4) anti-ES. (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) antígeno Ex (109,6 µg) e (C) antígeno ES (54 µg) 38

LISTA DE ABREVIATURAS

- SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
- WB = Western blot
- KDa = Kilodalton
- Anti-Pe = Anticorpo anti-líquido perientérico
- Anti-Ex = Anticorpo anti-extrato solúvel bruto
- Anti-ES = Anticorpo anti-material excretor-secretor
- Ag = Antígeno
- A = Aparecimento e ascensão da oviposição confirmado pelo OPG
- P = Pico da oviposição confirmado pelo OPG
- D = Declínio da oviposição confirmado pelo OPG
- Au = Ausência da oviposição confirmado pelo OPG
- PBS = Tampão Fosfato Salino
- TBS-Tween (10x) = Tris 0,1M + NaCl 1,5M + Tween 20 (0,5%)
- BCIP/NBT = 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate / Nitro Blue Tetrazolium

RESUMO

Toxocara vitulorum é um parasita nematódeo de alta frequência no trato intestinal de búfalos, particularmente em bezerros búfalos de um a três meses de idade. Devido à sua alta morbidade e mortalidade, causa consideráveis prejuízos a bubalinocultura. A pesquisa objetivou a obtenção de antígenos de extrato larval solúvel bruto (Ex), do material excretor-secretor (ES) de larvas infectantes e do líquido perientérico (Pe) de adultos de *T. vitulorum*, bem como a separação das frações protéicas na mistura pelo SDS-PAGE, seguida da análise imunológica por “Western blot” (WB), utilizando-se soros imunes e colostros de búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum* além de camundongos imunes. O acompanhamento do quadro parasitário dos bezerros búfalos também foi realizado. Pôde-se verificar que os três antígenos, Pe, Ex e ES, apresentaram mobilidades eletroforéticas pelo SDS-PAGE revelando nove (11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa), onze (11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82 e 96 KDa) e oito (19, 48, 56, 64, 90, 110, 150 e 190 KDa) bandas protéicas, respectivamente. A maioria dessas frações separadas pela eletroforese, foi reconhecida por todos as amostras de soros e pelo colostro, quando analisada pelo WB. No entanto, somente as bandas de alto peso molecular (68 – 190 KDa) persistiram nos grupos de bezerros búfalos que se encontravam no pico, declínio ou expulsão e na ausência ou autocura, à exceção do antígeno ES, que desapareceu durante o processo de autocura. Já os soros de bezerros búfalos com um de vida, que mamaram o colostro e os daqueles que se encontravam em fase de aparecimento ou ascensão, revelaram com as mesmas frações detectadas no soro e no colostro das búfalas. Os três antígenos reagiram de forma cruzada entre si, quando foram testados com soros homólogos e heterólogos de camundongos imunizados experimentalmente com estes antígenos de *T. vitulorum*.

Palavras-chave: *Bubalus bubalis*, *Toxocara vitulorum*, SDS-PAGE, “Western blot”.

ABSTRACT

Toxocara vitulorum is a nematode parasite of small intestine of cattle and water buffaloes particularly buffalo calves with one to three months of age, causing high morbidity and mortality. The purpose of this research was the antigen obtaintion and characterization of crude soluble larval extract (Ex), excretory-secretory (ES) of infective larvae, and perienteric fluid (Pe) from adults of *T. vitulorum*, as well as the separation of protein fractions from the antigenic mixture by SDS-PAGE and analysis of each band by Western blot (WB), using immune sera and colostrum of buffaloes naturally infected by *T. vitulorum*, and mice experimentally immunized. The parasitological status of the buffalo calves was also evaluated using sequentially coprological examinations. The results showed that three antigens, Pe, Ex and ES, revealed nine (11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112, and 165 KDa), eleven (11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82, and 96 KDa) and eight (19, 48, 56, 64, 90, 110, 150, and 190 KDa) protein bands by SDS-PAGE, respectively. The majority of these isolated bands were recognized by sera and colostrum of all groups of infected animals (buffalo cows one day post parturition and buffalo calves in five different periods of *T. vitulorum* infection) analyzed by WB. However, only the fractions of high molecular weight (68 - 190 KDa) persisted in the groups of buffalo calves at maximum peak of infection, expulsion and post-expulsion of the parasite or self-cure process, excepting ES antigen, that was not detected during the self-cure process. Sera of buffalo calves at one day of age, after suckling the colostrum and at the beginning of infection reacted with the same bands detected by serum and colostrum of the buffalo cows. The three antigens showed crossed reaction among themselves, when they were tested with homologous and heterologous sera of mice experimentally immunized with them.

Key words: *Bubalus bubalis*, *Toxocara vitulorum*, SDS-PAGE, Western blot.

INTRODUÇÃO

O búfalo doméstico ou indiano (*Bubalus bubalis*, variedade *bubalis*), também conhecido com búfalo de rio, é de origem Asiática e adapta-se perfeitamente em condições ambientais variadas. O manejo inadequado referente à saúde dos bubalinos constitui um dos maiores fatores limitantes à sua produção, mas apesar dos mesmos serem dotados de marcante rusticidade e de natural refratariedade a determinados agentes infecciosos, eles são susceptíveis as parasitoses. A maioria das doenças ocorrentes nesses animais, apesar de semelhantes às dos bovinos, assumem características próprias quanto à prevalência, patogenia e sintomatologia.

O *Toxocara vitulorum* (Warren, 1970) é um ascaridídeo pertencente à classe *Nematoda*, superfamília *Ascaridoidea*, família *Ascarididae*. Este nematódeo é citado no Paquistão, Ceilão, Índia, Malásia, Egito, Filipinas, Tailândia e Brasil como o principal agente parasitário causador da mortalidade entre os bubalinos jovens. Os parasitas adultos parasitam a primeira porção do intestino delgado de búfalos, principalmente, dos animais jovens. A maior ocorrência se dá em bubalinos entre 15 a 120 dias de idade, com pico da oviposição ocorrendo entre 30 e 50 dias. A partir dos 90 dias os animais adquirem resistência e eliminam naturalmente os parasitas do trato intestinal, pelas fezes. Além disso, devido sua alta morbidade e mortalidade causam consideráveis prejuízos a bubalinocultura.

Apesar dos parasitas adultos serem relativamente fáceis de serem controlados no intestino por quimioterápicos, as larvas são de difíceis tratamentos, principalmente quando estas se encontram em hipobiose na musculatura e no cérebro. Desta forma, as larvas hipobióticas nas búfalas adultas encontram-se em vantagem, favorecendo a sobrevivência da espécie e de sua disseminação através do colostro. O parasitismo pela fase larval é um processo crônico no qual a larva sobrevive no tecido, geralmente dentro de granulomas, resultando numa constante estimulação do sistema imune dos animais.

Por outro lado, o *T. vitulorum* é capaz de estimular a resposta imune celular e humoral dos bezerros búfalos, onde os anticorpos maternos contra este parasita são transferidos passivamente via colostro nos primeiros 15 dias pós-nascimento. Apesar desta imunidade não proteger os bezerros búfalos, evitando a instalação da parasitose, ela esta pode ter um papel importante na expulsão espontânea dos adultos. Além disso, observa-se aumento significativo de mastócitos e eosinófilos, no pico da oviposição, sugerindo também uma resposta celular ao nível de mucosa contra a manutenção prolongada destes parasitas na luz intestinal.

Assim sendo, há necessidade de se obter e caracterizar antígenos com potencial para estimular uma resposta imunológica dos búfalos, contra *T. vitulorum* visando não somente a larva migrante no hospedeiro (antígenos Ex e ES), mas também o adulto no lúmen intestinal (antígeno Pe).

Com base nos estudos da resposta imunológica destes animais frente a este parasitismo, objetivou-se a caracterização das frações antigênicas obtidas de larvas infectantes (extrato solúvel bruto (Ex) e material excretor-secretor (ES)) e de adultos (líquido perientérico (Pe)) de *T. vitulorum*. Para a caracterização, as frações antigênicas foram separadas por SDS-PAGE e analisadas por “Western blot” (WB). Amostras de soros e colostros de búfalas adultas no dia do parto e de bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum* durante o período de infecção intestinal (aparecimento ou ascensão, pico, declínio ou expulsão e ausência ou autocura) foram utilizadas, com a finalidade de detectar e caracterizar a presença de anticorpos anti-*T. vitulorum*. Soros hiperimunes heterólogos e homólogos obtidos em camundongos também foram analisados.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Importância do parasitismo por *T. vitulorum*

Toxocara vitulorum é um parasita nematódeo de alta prevalência no trato intestinal de búfalos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, responsável pelas altas taxas de morbidade e mortalidade, particularmente em bezerros búfalos de um a três meses de idade. Quando a toxocarose não é controlada em campo, a prevalência pode alcançar 100% e a taxa de mortalidade variar de 30% a 50% (LÁU, 1999) e alcançar os 80% (DAS & SINGH, 1955; ROBERTS, 1993 e BANERJEE et al., 1998). Os bezerros búfalos se infectam, principalmente através do colostro, contaminando posteriormente o meio ambiente com ovos de *T. vitulorum* eliminados pelas fezes (STARKE et al., 1983; ROBERTS, 1990a e BANERJEE et al., 1983).

De maneira geral, os bezerros búfalos encontram-se altamente infectados aproximadamente entre 30 e 50 dias de idade com pico de eliminação de ovos nas fezes entre 44 e 49 dias (STARKE et al., 1996; NEVES, 2001 e SOUZA, 2001). Em seguida ocorre um declínio na contagem dos ovos coincidindo com a expulsão natural dos parasitas adultos pelas fezes do hospedeiro, onde o OPG (ovos por grama de fezes) decresce rapidamente tendendo a zero aos 120 dias de idade (STARKE et al., 1983; LÁU, 1999; NEVES, 2001; SOUZA, 2001 e STARKE-BUZETTI et al., 2001).

Experimentos com *T. vitulorum* indicaram que os bezerros búfalos adquirem esta parasitose através da ingestão de larvas presentes no colostro (WARREN 1971; TONGSON, 1971; CHAUHAN et al., 1974; MIA et al., 1975; GAUTAM et al., 1976; BANERJEE et al., 1983; ROBERTS et al., 1990 e STARKE et al., 1992). Estas larvas permanecem nos tecidos até o dia do parto, no mesmo momento em que começam a crescer e migrar para as glândulas mamárias e subseqüentemente serem ingeridas pelos bezerros búfalos (ROBERTS, 1990b), demonstrando que a transmissão da infecção é

vertical com a búfala adulta atuando como um reservatório paratênico (WARREN, 1971 e ROBERTS, 1990b). Assim sendo, a transmissão transmamária de larvas infectantes pode ter um papel muito importante na infecção dos bezerros búfalos. Além disso, BANERJEE et al. (1983) ressaltaram a possibilidade do leite de búfala contaminado com larvas de *T. vitulorum* ter importância também em saúde pública, se o mesmo for consumido *in natura*.

Após a ingestão, as larvas penetram a mucosa intestinal e na migração para os pulmões as larvas rompem os capilares alveolares, migram para a traquéia onde são deglutidas e retornam ao intestino, alcançando a maturidade sexual e eliminam ovos com as fezes (ROBERTS, 1993). Desta forma, estudos clínicos da toxocarose nos bezerros búfalos, revelam que essas migrações larvais ocasionam sugestiva insuficiência hepática (GUPTA et al., 1976) em consequência à liberação de toxinas (DAS & SINGH, 1955) ou devido a lesões viscerais traumáticas (SRIVASTAVA, 1963). Além disso, GUPTA et al. (1976) observaram níveis elevados de histamina no sangue de bezerros infectados, correlacionados com as lesões teciduais e a toxemia. Como uma tentativa de proteção do hospedeiro parasitado, durante a rota de migração, as larvas podem ser encapsuladas, através de reações inflamatórias imunocelulares no fígado e nos pulmões, onde nestes locais muitas são mortas, embora, uma pequena proporção ainda consegue escapar, seguindo a migração para a musculatura esquelética do hospedeiro (WARREN, 1971).

ROBERTS (1990b) analisou o ciclo de vida de *T. vitulorum* utilizando larvas marcadas. Por este estudo, foi demonstrado que as larvas presentes no fígado e nos pulmões, um a oito dias antes do parto, migravam para as glândulas mamárias através de vasos sanguíneos. Nesse órgão, a larva continuava seu crescimento e 90% eram eliminadas através do colostro/leite, pela maioria das búfalas estudadas, durante os primeiros seis dias pós-parto. STARKE et al. (1992) também evidenciaram, a presença de larvas deste helminto no colostro/leite de 70% de búfalas, do parto ao 26º dia pós-parto. Sendo que 54,8% das búfalas mostraram-se positivas durante os dez primeiros dias pós-parto. Ovos de *T. vitulorum* foram também encontrados nas fezes dos bezerros búfalos, aos 20 dias sendo que aos 30 dias de idade, 100% destes animais já se encontravam parasitados.

2. Resposta imune dos búfalos frente ao parasitismo por *Toxocara*

A resposta imune celular contra larvas migratórias de *Toxocara canis* foi verificada por KAYES & OAKS (1978) que infectando camundongos com ovos deste parasita, observaram a formação de granulomas circundando a larva infectante na musculatura. O granuloma inicial caracterizava-se basicamente pela presença abundante de eosinófilos evoluindo para um infiltrado de células inflamatórias de processo agudo. Durante as 48 horas seguintes, a maioria dos eosinófilos encontrava-se sem grânulos e desintegrados. Os macrófagos eram acrescidos ao fragmento celular resultante do granuloma, onde as células mononucleares eram predominantes nas lesões no final de 28 dias de infecção. Após 11 semanas, a larva que se encontrava encapsulada por este granuloma assumia um aspecto epitelióide e fibrótico, sugerindo assim, a possibilidade de reação de hipersensibilidade tardia para toxocarose.

O aumento da população de eosinófilos e mastócitos também foi relatado na mucosa intestinal de animais infectados com nematódeos adultos. Desta forma, NEVES (2001) quantificando a população de mastócitos e eosinófilos tanto no duodeno quanto no jejuno de bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*, verificou um aumento significativo no número destas células nas fases do aparecimento, ascensão, pico e declínio da oviposição. Além disso, verificou eosinofilia durante todo o período em que os animais encontravam-se infectados. Este estudo sugeriu que as células imunes podem estar diretamente relacionadas com a resposta protetora na expulsão destes parasitas pelo hospedeiro, participando do processo de cura espontânea. No entanto, pouco se conhece a respeito do papel destas células neste processo.

Além da resposta imune celular, a resposta humoral também pode ser importante na defesa do hospedeiro contra os parasitas intestinais. Assim, RAJAPAKSE et al. (1994) investigaram os níveis de anticorpos anti-ES de larvas infectantes e de adultos de *T. vitulorum* quantificando-os pelos métodos de precipitação em gel e ELISA no soro e no colostro de búfalas adultas e no soro dos seus respectivos bezerros naturalmente infectados. Verificaram uma significativa correlação positiva entre os títulos de anticorpos no colostro das búfalas adultas com os títulos de anticorpos sorológicos dos bezerros búfalos. No entanto, houve uma correlação negativa entre a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) com o título de anticorpos sorológicos dos bezerros, indicando um possível papel destes anticorpos no controle deste parasita, pelo processo de expulsão do helminto. Resultados similares foram verificados por STARKE-

BUZETTI et al. (2001) detectando altos níveis de anticorpos anti-Ex de *T. vitulorum* pelo método ELISA indireto em soro de búfalos. Além disso, foi verificada alta reatividade dos anticorpos sorológicos das búfalas no periparto (30 dias antes e após o parto) e dos bezerros búfalos, principalmente durante os primeiros 15 dias após o nascimento, para aqueles que receberam o colostro. Por outro lado, nenhuma reatividade foi detectada no soro de bezerros búfalos com um dia de idade antes de receberem o colostro, indicando que os anticorpos IgG foram transferidos passivamente do colostro aos bezerros logo após o nascimento. No entanto, alguns autores observaram que durante o período de lactação ocorre uma depressão do sistema imunológico, com diminuição na concentração dos anticorpos séricos das búfalas. A diminuição foi possivelmente devido à transferência destes anticorpos para o colostro (AMERASINGHE et al., 1994).

Em outro estudo, SOUZA (2001) analisou a resposta imune humoral de búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum* através do método ELISA indireto utilizando os antígenos ES e Ex de larvas infectantes e o antígeno Pe de adultos de *T. vitulorum*. Anticorpos anti-Ex, anti-ES e anti-Pe foram sequencialmente detectados no colostro e no soro de búfalas adultas desde o parto até 365 dias pós-parto e no soro de bezerros búfalos, após receberem o colostro, do nascimento aos 365 dias de idade. Os níveis de anticorpos dos bezerros foram correlacionados com o quadro parasitológico, através do OPG. Os níveis de anticorpos, anti-Pe, anti-Ex e anti-ES, foram mais altos no soro das búfalas adultas durante o período do dia do parto até 365 dias pós-parto, permanecendo elevados e com pequena oscilação. Já no colostro, os anticorpos permaneceram elevados nos primeiros dias pós-parto (15 dias) porém, declinaram em seguida. Em relação aos soros de bezerros búfalos, os níveis mais elevados de anticorpos contra os três tipos de antígenos, foram detectados no primeiro dia de vida após os animais terem recebido o colostro e permaneceu elevado durante os primeiros 45 dias, ou seja, até o pico da oviposição. A expulsão dos parasitas ocorreu simultaneamente com o declínio na concentração de anticorpos, alcançando níveis mais baixos entre 60 e 105 dias de idade. Porém, em seguida, os bezerros búfalos começaram a produzir seus próprios anticorpos e adquiriram imunidade ativa, pois os anticorpos elevaram-se e permaneceram estáveis entre os dias 211 e 365. Estes resultados indicaram que a transferência passiva de anticorpos pelo colostro apesar de não ser suficiente para evitar a aquisição desta parasitose pelos bezerros búfalos, possivelmente, participou do processo de expulsão dos helmintos adultos.

Tentando verificar a possibilidade de uma proteção imunológica, CARRILLO & BARRIGA (1987) produziram 76% de proteção contra a infecção em ratos pela vacinação com o antígeno solúvel bruto de larvas de *T. canis*. Assim, acreditaram que os antígenos estimulavam a imunidade e, uma forte resposta protetora atuava sobre todas as larvas susceptíveis. Além disso, ABO-SHEHADA et al. (1991) imunizaram ratos com o antígeno ES de *T. canis* e verificaram que estes animais apresentaram uma maior reação inflamatória na mucosa intestinal, dificultando a penetração da larva. Já em relação ao *T. vitulorum*, AMERASINGHE et al. (1992) realizaram imunização parenteral de camundongos com uma variedade de antígenos solúveis deste parasita (extrato larval, excretor-secretor ou fluído perientérico e suas frações) e obtiveram uma proteção estatisticamente significativa contra a infecção. Os antígenos mais efetivos na proteção imunológica foram do fluído perientérico do parasita adulto (100% de proteção) e excretor-secretor de larvas infectantes de *T. vitulorum* (> 92% de proteção).

Finalizando, segundo BARRIGA & OMAR (1992) é possível o controle desta parasitose através de vacinação, e uma alternativa possível seria a imunização das búfalas adultas para matar as larvas em seus tecidos antes delas passarem para seus bezerras. No entanto, resta pesquisar e descobrir quais frações antigênicas o antígeno que provavelmente proporcionaria proteção ao animal, o seu mecanismo de ação e o tempo após a infecção que ele poderia ser isolado. Além disso, verificaram através de repetidas infecções experimentais por *T. vitulorum* em coelhos e usando antígenos de ovos embrionados, que o nível de IgE e IgMGA aumentava muito no soro após a terceira infecção. Pelo WB identificaram diferentes antígenos no curso da infecção, que poderiam estar relacionados com a proteção.

3. Caracterização antigênica dos antígenos de *Toxocara*

Estudos pioneiros com antígenos do gênero *Toxocara* foram realizados por SAVIGNY (1975) quando relatou que a larva infectante de *T. canis* em meio de cultura *in vitro* excreta e secreta uma substância antigênica, cuja produção total de proteína por larva foi estimada em 4 a 9 µg/dia. Este antígeno foi nomeado de antígeno excretor-secretor (ES), porém sua natureza imunológica ainda não estava suficientemente clara. SAVIGNY & TIZZARD (1977) e SAVIGNY et al. (1979) demonstraram que o antígeno ES produzido pelas larvas infectantes de *T. canis* mantidas *in vitro* poderiam ser os antígenos escolhidos para o sorodiagnóstico de toxocarose humana através do

teste ELISA. SMITH et al. (1981) e MAIZELS et al. (1983) demonstraram que a maior parte do antígeno ES era secretada para a superfície das larvas infectantes de *T. canis*. Em estudo posterior, MAIZELS et al. (1984) compararam o antígeno detectado na superfície das larvas infectantes de *T. canis* marcado pelo iodo radioativo com o antígeno ES liberado pela larva *in vitro* para demonstrar similaridades entre ambos e caracterizar suas propriedades físico-químicas e imunológicas. Estes autores, detectaram antígenos comuns com pesos moleculares de 32 e 120 KDa, porém uma banda de 400 KDa do antígeno ES não foi observada na superfície da larva. Além disso, as moléculas adicionais de 55 e 70 KDa estiveram presentes somente no antígeno ES. Os componentes detectados tanto na superfície quanto na secreção das larvas infectantes de *T. canis* revelaram-se antigênicos. Segundo HOGARTH-SCOTT (1966) citado por MAIZELS et al. (1984) os antígenos ES são secretados por glândulas e excretados por orifícios da larva que em seguida, podem depositar-se transitoriamente na cutícula para posteriormente sofrer modificações e alterações na sua dinâmica e posicionamento. Posteriormente, LOMBARDI et al. (1990) verificaram um material eletrodenso, encontrado na larva que facilitava a aderência das células sobre a superfície larval e formava uma camada que cobria toda a superfície do helminto. Esta substância podia ser liberada pelo parasita através das glândulas dos poros anais das larvas ou pelas glândulas esofagianas. Além disso, o antígeno ES também pode ser utilizado para diagnóstico da síndrome da *larva migrans visceral* através da técnica imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti-ES (PARSONS et al., 1986).

Recentemente alguns autores estudaram a composição bioquímica e a antigenicidade desta substância, designada como antígeno ES, secretada por larvas de ascaridídeos. No entanto, ainda existem discordâncias nestes estudos em relação ao número de componentes do antígeno ES de *T. canis*, assim como em seus pesos moleculares. Nisso, SUGANE & OSHIMA (1983), estudando o antígeno ES da larva infectante de *T. canis* isolado pela filtração em gel verificaram que esta molécula era uma glicoproteína e induzia a produção de anticorpos IgM, IgG e IgE no hospedeiro. Pela purificação antigênica foi revelado que essa glicoproteína continha 15% de carboidratos e apresentava 35 KDa de peso molecular. Da mesma forma, MEGHJI & MAIZELS (1986) caracterizaram o antígeno ES de *T. canis* de larvas infectantes pela técnica de SDS-PAGE seguido das técnicas de radioimunomarcagem e “immunoblotting” e verificaram que as moléculas do antígeno ES continham mais de 40% de carboidratos (N-acetilgalactosamina e galactose). O antígeno revelou bandas de

32, 55, 70, 120 e 400 KDa e além disso, foi possível estimar a produção de proteína por larva em 200 µg/dia. Posteriormente, BADLEY et al. (1987) demonstraram pela técnica PAGE, que as proteínas do antígeno ES de larvas de *T. canis*, visualizadas pela coloração por nitrato de prata, revelavam 15 bandas variando de 29 a 94 KDa e estimaram uma produção total de proteína por larva de 8 µg/dia.

4. Reação cruzada

Tentando demonstrar reações cruzadas entre os antígenos de ascaridídeos, KENNEDY et al. (1989) utilizaram as técnicas de radioiodinação, imunoprecipitação e SDS-PAGE e demonstraram que existe uma similaridade antigênica significativa em relação ao antígeno ES de *T. canis*, *A. lumbricoides* e *A. suum*, além do extrato somático (fluido perientérico) de adultos de *A. lumbricoides* e *A. suum* devido à proximidade filogenética, sendo, portanto, a banda de 14 KDa foi comum para os antígenos estudados. O perfil eletroforético do antígeno ES de larva infectante de *A. lumbricoides* foi praticamente o mesmo para o *A. suum*, com exceção da banda de 17 KDa presente somente no parasita específico dos humanos. Outro estudo comparativo entre antígenos de diferentes ascaridídeos foi realizado para evidenciar componentes moleculares espécies-específicas importantes em diagnósticos, principalmente em relação a toxocarose. Portanto, PAGE et al. (1991) determinaram a presença de similaridades ou de diferenças entre as moléculas dos antígenos Ex e ES de larvas infectantes de *T. canis* marcadas em meio de cultura. Além disso, compararam com os antígenos de *Toxascaris leonina* e *T. vitulorum* devido à proximidade filogenéticas entre os ascaridídeos. Todas as comparações foram feitas por eletroforeses uni e bi-dimensional, enquanto que as reações cruzadas entre as diferentes espécies foram analisadas por radio-imunoprecipitação. Uma sobreposição substancial foi revelada entre *T. canis* e *T. vitulorum* principalmente para os componentes entre 120 – 140 KDa e proximidades dos componentes de 32 e 55 KDa do antígeno ES de *T. canis* com os componentes de 30 e 45 KDa do *T. vitulorum*, ao passo que *Toxascaris* revelou um perfil antigênico mais distinto. O reconhecimento antigênico por anticorpos policlonais foi elevado para as três espécies e o *T. cati*, também utilizado, revelou consideráveis reações cruzadas. Observaram que as reações cruzadas foram mais evidentes entre as espécies de *Toxocara*. Sendo que os antígenos ES de *T. leonina* não foram reconhecidos pelos anticorpos monoclonais de *T. canis*, ao passo que a maioria desses anticorpos precipitou

os antígenos de *T. vitulorum*. Apenas o anticorpo monoclonal Tcn-2 de *T. canis* não reagiu com *T. vitulorum* indicando que esta reação foi espécie-específica e revelando potencial para o diagnóstico específico da toxocarose humana.

Em seguida, MASSRY (1999) realizando um estudo dos pesos moleculares pela técnica de SDS-PAGE entre o antígeno somático de *T. canis* e de *T. leonina*, adultos e larvas, verificou a existência de duas bandas similares (90,00-91,95 KDa e 69,25-70,56 KDa) para os antígenos dos parasitas adultos correspondentes. No entanto, o antígeno larval de *T. canis* apresentou um perfil antigênico muito diferente quando comparado ao antígeno de *T. leonina*, exceto para uma banda (66,85-66,89 KDa). Posteriormente, o WB revelou quatro bandas evidentes de imunorreação do antígeno somático de *T. canis* adulto com o soro de coelhos imunizados experimentalmente com o parasita correspondente (125,37, 117,73, 90,00 e 69,25 KDa), enquanto o antígeno de *T. leonina* apresentou três bandas de imunorreação com o soro de coelho hiperimune correspondente (119,04, 91,95 e 70,56 KDa). Por outro lado, ZARNOWSKA & JASTRZEBSKA (1994) detectaram 15 frações protéicas pelo SDS-PAGE, no antígeno ES de larvas infectantes de *T. canis*, com pesos moleculares de 19 a 200 KDa (coradas por azul de Coomassie) e nove glicoproteínas, com pesos moleculares 19-55 e 130 KDa coradas pelo PAS (“periodic acid Schiff”). Além disso, quase todos os polipeptídeos foram reconhecidos pelos anticorpos presentes nos soros de pacientes positivos para toxocarose (larva migrans visceral e ocular). Pela análise de WB, somente as bandas de 185-200 KDa e 63 KDa não foram reconhecidas, mas somente uma banda adicional de 14 KDa, não observada pelo azul de Coomassie, foi detectada pelo WB. Reação cruzada em 20% dos soros de pacientes positivos para triquinelose foi observada na diluição de 1:50, porém nenhuma reação cruzada foi constatada nos polipeptídeos com pesos moleculares abaixo de 39 KDa, sugerindo serem mais específicos para detectar anticorpos anti-*T. canis*.

ASHOUR et al. (1995) investigaram o grau da homogenicidade e heterogenicidade do extrato de proteínas de adultos de *Toxascaris leonina*, *Parascaris equorum*, *T. canis* e *T. vitulorum* pela técnica de SDS-PAGE. A análise comparativa mostrou que 13 bandas foram comuns para as quatro espécies estudadas e *T. vitulorum* pareceu ser a espécie mais divergente. ABDEL-RAHMAN et al. (2000) investigaram a homologia estrutural de ovos de *Fasciola gigantica*, *Moniezia expansa* e *T. vitulorum*. Pelo WB, 9, 11 e 7 polipeptídeos foram reconhecidos em ovos de *F. gigantica*, *M. expansa* e *T. vitulorum*, respectivamente, por seus respectivos anti-soros produzidos em

coelhos. Além disso, componentes de 240 KDa e 206 KDa foram reconhecidos nas três espécies, revelando reação cruzada.

Como se pôde observar pela revisão de literatura, várias pesquisas tem sido realizada para se conhecer as moléculas protéicas dos parasitas, havendo maior ênfase ao antígeno ES de *T. canis*, visando o controle/diagnóstico da toxocarose humana, de importância em saúde pública. Já com relação ao *T. vitulorum*, pouco se conhece, principalmente, do papel de possíveis moléculas antigênicas/imunogênicas capazes de estimular o animal para proteção imune contra esta parasitose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local

A pesquisa foi executada na Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - Universidade Estadual Paulista (FEIS/UNESP) situada à margem direita do Rio Paraná, no município de Selvíria, do Estado de Mato Grosso do Sul. A execução laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia/Imunologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da FEIS/UNESP.

2. Animais e manejo

Foram utilizados bezerros búfalos (machos e fêmeas), mestiços (Murrah x Mediterrâneo), com idades variando de recém-nascidos até um ano e búfalas adultas, no dia do parto. O regime de criação destes animais foi extensivo, com os bezerros búfalos permanecendo junto com as mães até o desmame, pois as búfalas não eram ordenhadas. O rebanho bubalino foi mantido em pastagem de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). A reprodução foi através de monta natural, com nascimentos concentrados entre janeiro e abril de 1999.

3. Obtenção e preparação do antígeno de *T. vitulorum*

3.1. Obtenção das larvas infectantes

A obtenção de larvas infectantes seguiu conforme a técnica de RAJAPAKSE et al. (1992) com algumas modificações. Machos e fêmeas adultas de *T. vitulorum* foram coletadas de bezerros naturalmente infectados pela eliminação destes pelas fezes com

anti-helmíntico à base de piperazina, na dosagem de 100 a 150 mg/kg de peso vivo do animal.

As fêmeas foram previamente lavadas com detergente neutro e enxaguadas com água destilada até que estivessem completamente livres de resíduos fecais. Logo após, foram separadas e colocadas em placas de Petri efetuando a dissecação e a retirada dos úteros contendo os ovos. Para a retirada do útero, foi feito um corte transversal na altura do esôfago do parasita e com o auxílio de uma pinça, foi prensada a extremidade posterior e, com um estilete, o corpo do parasita foi pressionado no sentido postero-anterior para ajudar na expulsão do seu conteúdo. Com o auxílio de um pinça pequena, foi separado o intestino do útero. Após a retirada do útero, este foi novamente deslocado em placas de Petri e perfurado para facilitar a liberação dos ovos. Em seguida, a suspensão dos ovos foi deixada nas placas de Petri de aproximadamente 8 cm de diâmetro, contendo água destilada numa profundidade de 0,5 a 1,0 cm sendo deixadas à temperatura ambiente, de acordo com a técnica de SMITH (1989) com algumas adaptações.

Diariamente as placas de Petri foram destampadas e agitadas por movimentos rotatórios para oxigenar a água. Após dois a quatro dias em geral, tempo médios em que os úteros já se encontravam deteriorados e, então, esse material foi passado em peneira com malha de náilon 0,2 mm de abertura.

O material coado (ovos livres dos detritos) foi centrifugado cinco vezes a 1.000 rpm por dois minutos e em seguida foi deixado para incubar em temperatura ambiente, agitando-se diariamente para manter a oxigenação. A segmentação dos ovos foi acompanhada por exames diários ao microscópico óptico, até o desenvolvimento da larva infectante (25 a 35 dias). Após a incubação dos ovos até a forma infectante, estes ovos foram colocados em tubos de centrífuga (15 ml) e ao sedimento foi colocado igual volume de solução de hipoclorito de sódio (5% de cloro) por 20 minutos. Em seguida, o material foi lavado oito vezes através de centrifugação em 2000 rpm por dois minutos. Com este processo o ovo perdeu a sua camada externa, permanecendo assim, a larva envolta pela membrana vitelina. A liberação dessas larvas da membrana vitelina foi feita através de rápida agitação manual ou oxigenação com auxílio de pipeta de Pasteur, em banho-maria a 37°C.

3.2. Preparação do antígeno

a) Extrato solúvel bruto de larvas infectantes (Ex)

Este antígeno foi processado segundo o método de STARKE-BUZETTI et al. (2001). As larvas infectantes de *T. vitulorum* foram ultra-sonicadas, com auxílio do aparelho ultra-sônico (Vir Sonic 1001, Virtis[®]), em média de três ciclos (monitorado em microscópio óptico), com potência de 10 watts e pulsações contínuas. Entre cada ciclo, a ponteira do aparelho foi mantida em solução de PBS gelada e o recipiente contendo as larvas em manipulação foi deixado imerso em água contendo gelo triturado. Neste material sonicado foi adicionado um inibidor de protease na proporção de 1 ml do inibidor/10ml de solução de antígeno. Esta suspensão foi deixada a 4°C por uma noite e posteriormente centrifugado, por duas vezes seguidas: a primeira a 3000 rpm por 10 minutos e a segunda por 16000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 10°C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,2 µm (Gelman Sciences[®]) e alíquotizadas (500 µl) em tubos de Eppendorf. As amostras foram concentradas com auxílio de uma centrífuga a vácuo (Vacufuge Concentrator 5301, Eppendorf[®]). Em seguida, estas alíquotas foram estocadas a -70°C.

b) Material excretor-secretor (ES)

O antígeno ES foi obtido pela cultura das larvas infectantes (10.000/ml) em meio de cultura, como descrito por RAJAPAKSE et al. (1992), contendo:

- 10 ml de RPMI-1640 (Sigma R-4130);
- 1% de glicose;
- 0,85% de NaHCO₃;
- Solução antibiótico/antimicótico (Sigma, A-5955) contendo 5.000 UI de penicilina, 5 mg de estreptomicina e 10 µg anforetericina B.

O meio foi corrigido para pH neutro e filtrado com membranas de 3 µm de porosidade (Gelman Sciences[®]). O meio de cultura permaneceu a 37°C em estufa (CO₂ Incubator, Sanyo[®]) com injeção de 5% CO₂, por uma semana, segundo RAJAPAKSE et al. (1992). Semanalmente, foi recolhido o sobrenadante da suspensão larval em cultura, realizando centrifugação a 2.000 rpm por cinco minutos.

O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,2 μm (Gelman Sciences[®]) e foi adicionado ao líquido o inibidor de protease, na proporção de 1 ml inibidor/10 ml de solução de antígeno.

Em seguida foi realizada uma diálise do líquido coletado com membrana apropriada (Spectra/Por DispoDialyzers, Spectrum[®]). A diálise foi realizada por 24 horas a 4°C, em béquer contendo dois litros de PBS a 0,01 M e pH 7,4 sob agitação constante, com auxílio de um agitador magnético (Agitador Magnético TE-085, Tecnal[®]) a 10 rpm. Após 24 horas, as amostras foram aliquotizadas e concentradas em centrífuga a vácuo em tubos de Eppendorf (500 μl cada), em seguida estocadas a -70°C.

c) Líquido Perientérico (Pe)

O antígeno Pe foi obtido seguindo-se a técnica de AMERASINGHE et al. (1992) com algumas adaptações. A partir de fêmeas e machos adultos de *T. vitulorum*, através de punções com auxílio de agulhas hipodérmicas na extremidade posterior dos parasitas, foi coletado o líquido perientérico. Em seguida, o líquido foi centrifugado a 2.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (Pe) foi filtrado em membranas de 0,2 μm (Gelman Sciences[®]) e adicionado inibidor de proteases na proporção de um ml de inibidor para cada 10 ml do Pe. Em seguida procedeu-se a diálise como feito para o antígeno ES, aliquotizado em tubos de Eppendorf com 500 μl cada e estocados a -70°C.

4. Quantificação da proteína

A concentração protéica dos antígenos foi determinada pelo método de HARTREE (1972). A leitura foi realizada em absorbância (650 nm) com espectrofotômetro CE 2041 200-Series (Cecil[®]).

5. Conservação do antígeno

As moléculas protéicas quando extraídas de organismos vivos podem ser degradadas pelas enzimas proteases liberadas durante o processo de extração (MAIZELS, 1991). Para evitar que isto acontecesse, foi utilizado o inibidor de proteases

(Sigma, P-2714) reconstituídos em PBS para conservação dos antígenos de acordo com a metodologia descrita por PAGE et al. (1991).

6. Amostras de material

6.1. Fezes

As amostras fecais para realização de exames coprológicos foram coletadas de bezerros búfalos ($n = 20$), com a finalidade de agrupá-los em fases distintas (aparecimento ou ascensão, pico, declínio e expulsão) da infecção intestinal. Estas amostras pertenceram aos animais nascidos no início de 1999 e coletadas em períodos que se segue:

- Dia do nascimento até 90 dias de vida (semanalmente).
- Dos 91 aos 180 dias de vida para confirmação de ausência da oviposição de *T. vitulorum* (quinzenalmente).
- Dos 181 aos 365 dias para verificar possível reinfecção por *T. vitulorum* (mensalmente).

O material fecal foi coletado manualmente, direto do reto do animal, utilizando-se sacos plásticos. Este material foi devidamente identificado e transportado para o laboratório em caixas de isopor com gelo. No laboratório, as amostras fecais foram mantidas em geladeira (4°C) até a realização do exame coprológico pela técnica de WHITLOCK (1948), utilizando-se câmaras de McMaster para contagem de ovos por grama de fezes (OPG).

6.2. Amostras de soro de bezerros búfalos naturalmente infectados

Os soros dos bezerros búfalos foram coletados diretamente da veia jugular e separados por faixa etária de acordo com o grau da infecção intestinal da seguinte forma:

- a) Com um dia de idade antes de receberem o colostro (soros de referência negativa).
- b) Com um dia de idade depois de receberem o colostro.
- c) No aparecimento e ascensão da oviposição.
- d) No pico da oviposição.
- e) No declínio (expulsão) da oviposição.

f) Na ausência (autocura) da oviposição.

A coleta de sangue foi semanal (do nascimento aos 90 dias de vida), quinzenal (91 a 180 dias de vida) e mensal (181 a 365 dias de vida).

Para a realização do WB, as amostras de soros foram agrupadas (“pool”) escolhendo 5 grupos de 5 animais (Tabela 1) previamente testados sorologicamente pelo teste ELISA indireto, conforme SOUZA (2001) e de acordo com seus respectivos OPG.

TABELA 1 – Bezerros búfalos naturalmente infectados por *T. vitulorum* nascidos no ano de 1999 segundo OPG e absorvância pelo método ELISA indireto, Ilha Solteira - SP, 2002.

Soro imune de bezerros búfalos com 1 dia de idade após receberem o colostro					
Número do bezerro	Idade (dias)	OPG	ELISA – Absorvância (405 nm)*		
			Pe	Ex	ES
224	1	0	1,733	2,138	2,061
232	1	0	1,829	2,130	2,252
234	1	0	2,180	2,507	2,329
235	1	0	1,778	2,091	1,905
239	1	0	1,692	1,912	1,938
Soro imune de bezerros búfalos no aparecimento e ascensão da oviposição					
218	28	9.200	1,680	1,668	1,261
224	30	500	1,430	1,889	1,525
226	32	1.200	1,436	1,510	0,924
235	28	2.350	1,440	1,919	1,631
236	34	2.350	1,246	2,046	1,607
Soro imune de bezerros búfalos no pico da oviposição					
218	35	16.600	1,573	1,638	1,052
231	35	23.400	NT	NT	NT
234	45	5.750	1,320	1,582	1,310
235	48	31.100	NT	NT	NT
237	40	34.650	NT	NT	NT
240	36	9.450	1,465	2,171	1,746
Soro imune de bezerros búfalos no declínio (expulsão) da oviposição					
224	64	300	1,181	1,739	1,096
226	66	1.300	0,393	0,915	0,493
228	64	0	1,172	1,312	0,851
230	70	0	1,251	1,352	0,783
234	97	100	1,400	1,204	1,112
Soro imune de bezerros búfalos na ausência (autocura) da oviposição					
224	228	0	2,498	1,864	1,511
229	232	0	1,646	1,728	1,014
230	232	0	1,309	1,212	0,954
232	238	0	1,725	1,336	1,025
239	223	0	1,719	1,843	0,627

NT – Soro não testado

* Dados do ELISA fornecidos por SOUZA (2001).

6.3. Amostras de soro de búfalas adultas naturalmente infectadas

O sangue foi coletado diretamente da veia jugular de búfalas. Amostras de soro de búfalas adultas naturalmente infectadas por *T. vitulorum* no dia do parto por ter se observado, pelo método ELISA indireto, ser o soro de referência positiva, após apresentarem o nível mais elevado de anticorpos anti-Pe, anti-Ex e anti-ES. Desse modo, os soros destas búfalas foram agrupados (“pool” de 10 amostras), para serem analisados pelo WB.

6.4. Amostras de colostro de búfalas adultas naturalmente infectadas

As amostras de colostro das búfalas adultas naturalmente infectadas foram coletadas através da ordenha manual em frascos de 50 ml, no dia do parto, transportadas ao laboratório em caixa de isopor com gelo. Estas amostras foram inicialmente centrifugadas a 461,9 G em centrífuga refrigerada Hermle - Z323K (Labnet®) a 4°C, por 15 minutos. A seguir descartou-se a gordura concentrada na superfície superior do tubo com a amostra. Cerca de 8 gotas de coalho comercial, contendo ácido bórico, o qual possui poder “coagulante”, ou seja, de precipitar a caseína do leite, foram adicionadas ao mesmo. E este permaneceu incubado à 37°C, em estufa incubadora para B.D.O. (Fanem®) pelo tempo suficiente para que o leite coagulasse. O coágulo foi levemente homogeneizado, centrifugado pelo mesmo tempo e rotação da primeira centrifugação. O sobrenadante foi separado e estocado a -70°C. Em seguida, as amostras foram agrupadas (“pool” de 10 amostras), para serem analisadas pelo WB.

6.5. Amostras de soro hiperimune de camundongos

Foram utilizados 20 camundongos adultos, machos da linhagem Rockefeller, adquiridos do Biotério Central da UNESP - Câmpus de Botucatu. Os camundongos foram alojados em gaiolas especializadas em sala climatizada (25°C).

- Separados em quatro grupos de camundongos machos (n = 5) por gaiola (grupo controle, Ex, ES e Pe). Os camundongos ficaram em um período de adaptação por 21 dias.

- Para obtenção de soro-imune dos camundongos 20 µg/ml de cada antígeno (Ex, ES ou Pe) por animal foram inoculados intra-peritonealmente, segundo o seguinte esquema:

Dia 1 - Imunização com antígeno Ex, ES ou Pe + adjuvante completo de Freund;

Dia 14 - Imunização com antígeno Ex, ES ou Pe + adjuvante incompleto;

Dia 21 - Imunização com antígeno Ex, ES ou Pe + adjuvante incompleto;

Dia 35 – Exsangüinação e obtenção do soro através de punção cardíaca, instantes após a eutanásia com éter etílico, utilizando o sistema a vácuo de coleta sanguínea dos camundongos.

6.6. Processamento e agrupamento dos soros

Após a coagulação do sangue em temperatura ambiente, o soro foi separado do coágulo em centrifugador Excelsa Baby (Fanem[®]) a 2.000 rpm, por 10 minutos. As amostras de soro foram alíquotizadas, identificadas e conservadas a -70°C.

Para o WB, os soros de todos os grupos foram agrupados em “pool” de cinco amostras para todos os grupos de bezerros búfalos, 10 amostras para as búfalas (referência positiva) no dia do parto e 10 amostras de colostro, além dos grupos de soros de camundongos, como segue abaixo:

- “Pool” dos soros de referência negativa (bezerros búfalos antes de receberem o colostro).
- “Pool” dos soros de referência positiva (búfalas no dia do parto) selecionado pelo método ELISA indireto.
- “Pool” do colostro selecionado pelo método ELISA indireto.
- “Pool” dos soros de bezerros búfalos com um dia de vida após receberem o colostro.
- “Pool” dos soros de bezerros búfalos indicando o aparecimento e ascensão da oviposição confirmado pelo OPG e pelo método ELISA indireto.
- “Pool” dos soros de bezerros búfalos indicando o pico da oviposição confirmado pelo OPG e pelo método ELISA indireto.
- “Pool” dos soros de bezerros búfalos indicando o declínio da oviposição confirmado pelo OPG e pelo método ELISA indireto.

- “Pool” dos soros de bezerras búfalos indicando ausência da oviposição confirmado pelo OPG e pelo método ELISA indireto.
- “Pool” dos soros do grupo controle dos camundongos.
- “Pool” dos soros do grupo anti-Pe dos camundongos.
- “Pool” dos soros do grupo anti-Ex dos camundongos.
- “Pool” dos soros do grupo anti-ES dos camundongos.

7. Caracterização e análise dos antígenos

7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os antígenos, preparados conforme mencionado anteriormente, foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Tabela 2). Para a corrida eletroforética foi usado gel de poliacrilamida numa concentração de 12% como descrito por LAEMMLI (1970) e adaptado por MACHADO et al. (1997). A concentração protéica de cada antígeno a ser usada foi padronizada.

Para a eletroforese, as amostras dos antígenos Pe, Ex e ES foram separadas e aliqüotizadas de acordo com o protocolo seguinte: a eletroforese foi realizada em um aparato “Penguin Water-Cooled Dual-Gel Electrophoresis System” (Owl Separation Systems[®]), com a resolução do gel (10 cm x 10 cm) de 12% de concentração, suplementada com 5 µl de Temed (Sigma, T-9281) e persulfato de amônio 10% (Sigma, A-3678) em tampão TRIS-HCl (1 M, pH 8,8) e Bis 0,8%/Acrilamida 30%. O gel foi preenchido com o antígeno por linha alternadamente com quatro repetições na mesma concentração, em placas separadas, e a eletroforese monitorada usando o azul de bromofenol 1% (Sigma, B-8026), em uma corrente constante de 30 mA. A eletroforese foi interrompida quando o azul de bromofenol havia percorrido quase todo o gel. Em seguida, o gel foi imerso em uma solução corante-fixadora (\pm 20 ml) por 20 minutos contendo metanol 45%, ácido acético glacial 10% e azul de Coomassie 0,1% (Sigma, B-0149), em seguida imerso numa solução descorante (\pm 50 ml) por 1 hora (metanol 10%, ácido acético glacial 10%), por último numa solução secadora (metanol 40% e glicerol 3%) conforme BOLLAG & EDELSTEIN (1991). O peso molecular dos antígenos foi

calculado comparando com peso molecular do padrão (M-0671, Sigma) de acordo com a mobilidade relativa (MR):

$$MR = \frac{\text{Distância.da.migração.da.proteína}}{\text{Distância.da.migração.do.azul.de.bromofenol}}$$

Os valores das MRs (ordenada) são relacionados aos pesos moleculares conhecidos (abscissa) em um gráfico semilogarítimo, servindo de base de interpolação para outras proteínas.

Os géis com as bandas protéicas foram eletroforeticamente transferidos para membranas de nitrocelulose (0,22 μ m) de acordo com o procedimento descrito por TOWBIN et al. (1979) para realização do WB.

7.2. “Western blot” (WB)

Após a separação dos antígenos por SDS-PAGE foi realizado o teste de WB em duas repetições para analisar as frações protéicas na mistura complexa pelos anticorpos anti-*T. vitulorum* dos soros de camundongos experimentalmente imunizados (Tabela 3), bezerros búfalos (Tabela 4) e búfalas adultas no dia do parto (Tabela 5) naturalmente infectados. Segundo SCOTT (1989) este teste é comumente usado para análise de proteínas separadas pelo SDS-PAGE depois de redução pelo 2-mercaptoetanol ou ditioeritrol e aquecidos a 100°C.

O gel foi retirado da placa de eletroforese e mergulhado no tampão de transferência (tampão tris-glicina-metanol) além das esponjas, filtros e membranas de nitrocelulose (Sigma, N-6395) por 30 minutos. Foi montado o sanduíche banhado em tampão de transferência e fixado a cuba eletroforética para executar a transferência por 12 horas à 35V constante. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada em solução Ponceau-S 0,5% (Mallinckrodt, C.I.27195) em solução de ácido acético a 1% e, em seguida, foi cortada em tiras e previamente descoradas em TBS-Tween. As tiras foram incubadas em solução de 5% leite em pó desnatado em TBS adicionada de soro de coelho a 5% por 90 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com os soros testes (soros de búfalos e camundongos) diluídos 1:50 em solução de 5% leite em pó, sob agitação constante, à temperatura ambiente, em intervalos padronizados, em um homogenizador circular (Glas-Col®). Posteriormente, foram lavadas três vezes antes de serem incubadas com o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (anti-bovine IgG alkaline phosphatase conjugate, Sigma A-7914) diluído 1:30.000 e adicionadas em

solução de 5% leite em pó. Após as lavagens, as amostras foram incubadas e monitoradas com o substrato enzimático (BCIP/NBT, Calbiochem, 203790) até o aparecimento das bandas nas tiras (\pm 10 min.) de acordo com BLAKE et al. (1984) adaptado por MACHADO et al. (1997).

Para excluir a possibilidade de reação inespecífica, o teste WB foi realizado na ausência do soro teste, ou na ausência do conjugado, ou na ausência do substrato. Além da substituição do soro teste pelo soro fetal bovino. Todos estes testes apresentaram resultados negativos.

8. Delineamento experimental

TABELA 2 - Separação das frações antigênicas em eletroforese.

	Padrão (Sigma, M-0671)	Antígeno		
		Pe	Ex	ES
SDS-PAGE	X	X	X	X

TABELA 3 - WB dos soros obtidos de camundongos imunizados contra antígenos Ex, ES e Pe.

Soro hiperimune de camundongos			
Antígeno	Pe	Ex	ES
Pe	X	X	X
Ex	X	X	X
ES	X	X	X

TABELA 4 – WB dos soros obtidos de bezerros búfalos naturalmente infectados em diferentes faixas etárias.

Soro de bezerros búfalos naturalmente infectados						
Antígeno	1 dia (antes de receber o colostro) ¹	1 dia (após receber o colostro)	16-39 dias (A)	40-47 dias (P)	48-117 dias (D)	223-238 dias (Au)
Pe	X	X	X	X	X	X
Ex	X	X	X	X	X	X
ES	X	X	X	X	X	X

1- Referência negativa

A - Aparecimento e ascensão da oviposição confirmado pelo OPG

P - Pico da oviposição confirmado pelo OPG

D - Declínio da oviposição confirmado pelo OPG

Au - Ausência da oviposição confirmado pelo OPG

TABELA 5 – WB de soro e colostro obtidos de búfalas adultas no dia do parto.

Antígeno	Soro ¹ e colostro de búfalas adultas (Dia do parto)
	Pe
Ex	X
ES	X

1- Referência positiva

RESULTADOS

1. Parâmetros parasitológicos

O grau da infecção intestinal por *T. vitulorum* em bezerros búfalos foi avaliado através de contagens de ovos por grama de fezes (OPG) de acordo com WHITLOCK (1948). Através de amostras de fezes examinadas semanalmente desde o nascimento dos bezerros até 180 dias aproximadamente (Tabela 6 e Figura 1), foi observado que os bezerros búfalos iniciaram a oviposição aos 16 dias, atingiram o pico de OPG entre 40 e 47 dias (Tabela 6 e Figura 1). Após o pico, o número de ovos começou a declinar, até apresentar-se nulo a partir dos 118 dias (Tabela 6). Pôde-se constatar que a infecção intestinal apresentou quatro fases distintas (Figura 1):

- Aparecimento e ascensão entre 16 a 39 dias de idade;
- Pico entre 40 a 47 dias de idade;
- Declínio (expulsão) entre 48 a 117 dias de idade e
- Ausência (autocura) a partir de 118 dias de idade.

TABELA 6 – Número de ovos de *T. vitulorum* por grama de fezes de bezerros búfalos naturalmente infectados segundo a idade, número de animais analisados e amplitude de variação, com idades de 1 a 192 dias, Ilha Solteira – SP, 2002.

Idades (dias)	Quantidade de bezerros analisados	OPG (média)	Amplitude
1	9	0	0
2-7	10	0	0
8-15	20	0	0
16-23	21	11,9	0 – 250
24-31	17	1570,6	0 – 7400
32-39	16	5353,1	0 – 23400
40-47	18	8525,0	0 – 55450
48-55	16	6009,4	0 – 31100
56-63	10	3070,0	600 – 7800
64-71	11	2463,4	300 – 6550
72-79	6	1200,0	400 – 3050
80-87	8	525,0	100 – 1200
88-102	15	190,0	0 – 1150
103-117	11	54,5	0 – 250
118-132	13	0	0
133-147	13	0	0
148-162	7	0	0
163-177	5	0	0
178-192	2	0	0

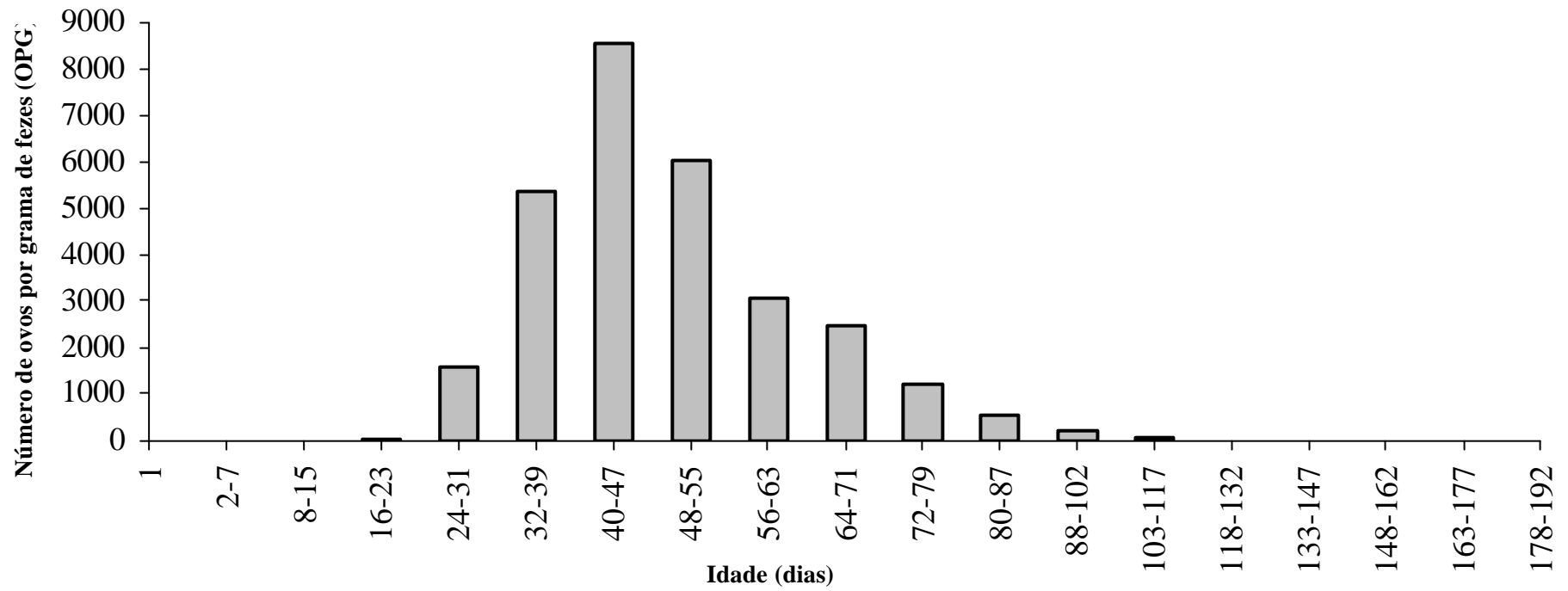


FIGURA 1 – Número de ovos de *Toxocara vitulorum* por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos nascidos no ano de 1999, segundo a idade.

2. SDS-PAGE

As Figuras 2, 4 e 6 apresentam as análises eletroforéticas dos antígenos Pe, Ex e ES em diferentes concentrações, coradas com azul de Coomassie. De acordo com as mobilidades relativas no SDS-PAGE 12%, o antígeno Pe revelou nove frações protéicas (11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa), o antígeno Ex revelou onze (11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82 e 96 KDa) e o antígeno ES revelou a presença de oito (19, 48, 56, 64, 90, 110, 150 e 190 KDa) (Figuras 3, 5 e 7).

Os antígenos Pe e Ex mostraram-se idênticos quanto à concentração de proteínas pelo método de HARTREE (1972) de 13,7 mg/ml, enquanto que a do antígeno ES foi de 2,7 mg/ml. A melhor visualização das frações protéicas separadas pelo SDS-PAGE foram de 41,1 µg para o antígeno Pe, 109,6 µg para o antígeno Ex e 54 µg para o antígeno ES (Figuras 3, 5 e 7).

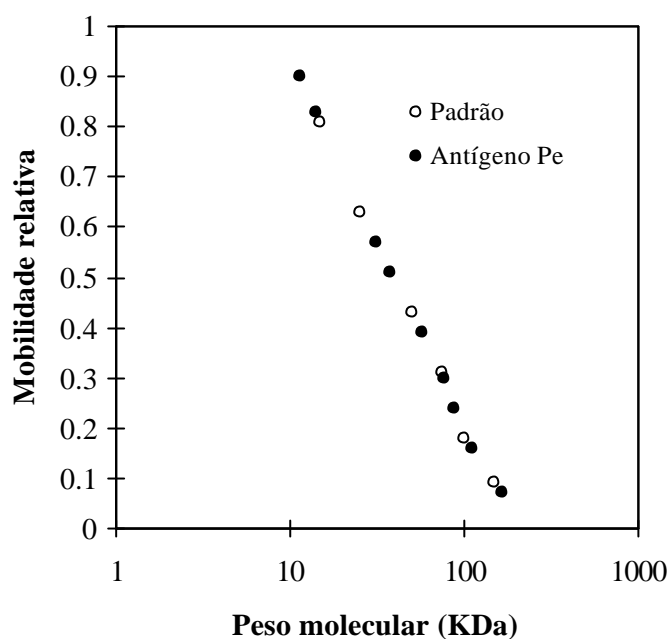


FIGURA 2 – Mobilidade relativa do antígeno Pe em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie.

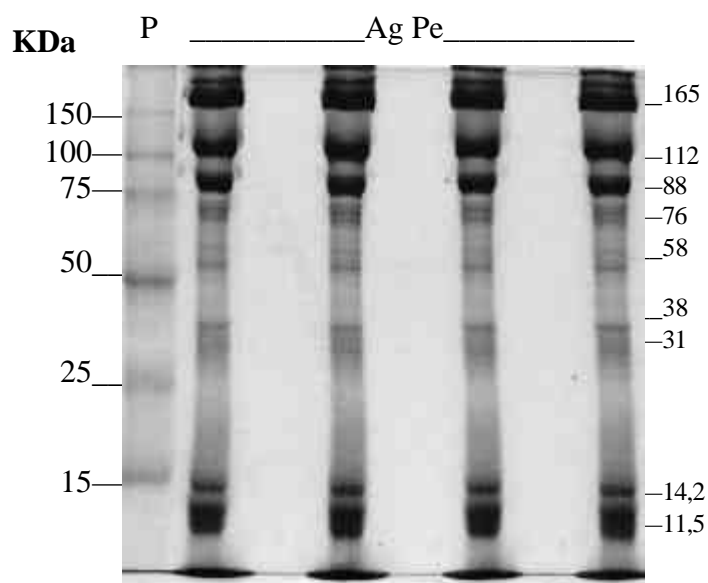


FIGURA 3 – SDS-PAGE a 12% do antígeno Pe de *T. vitulorum* revelando pesos moleculares de 11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 41,1 μ g. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671).

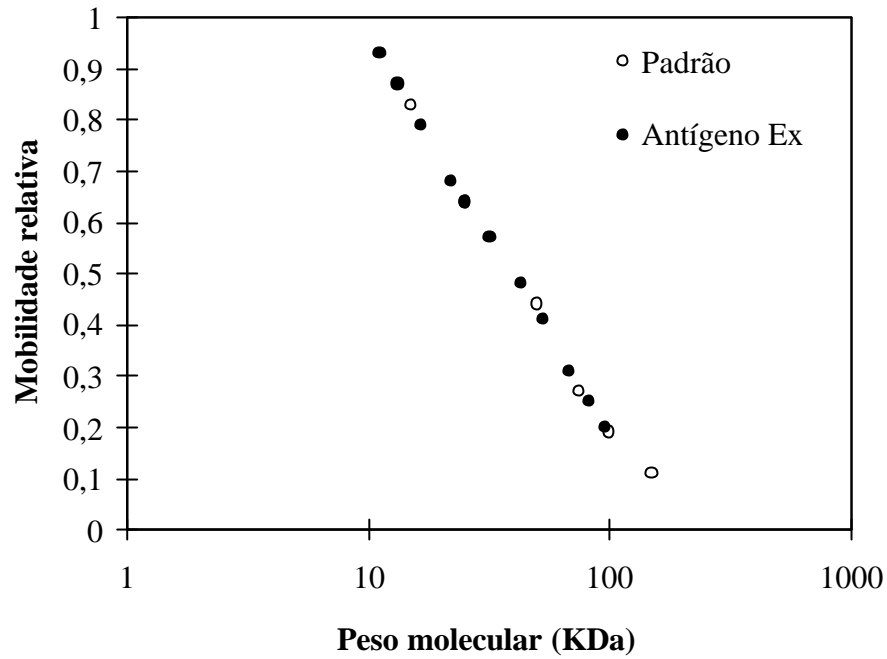


FIGURA 4 – Mobilidade relativa do antígeno Ex em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie.

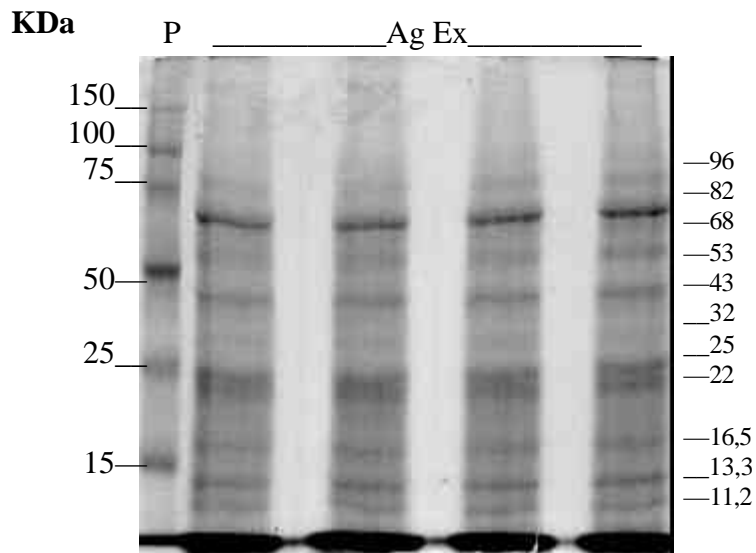


FIGURA 5 – SDS-PAGE a 12% do antígeno Ex de *T. vitulorum* revelando pesos moleculares de 11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82 e 96 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 109,6 µg. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671).

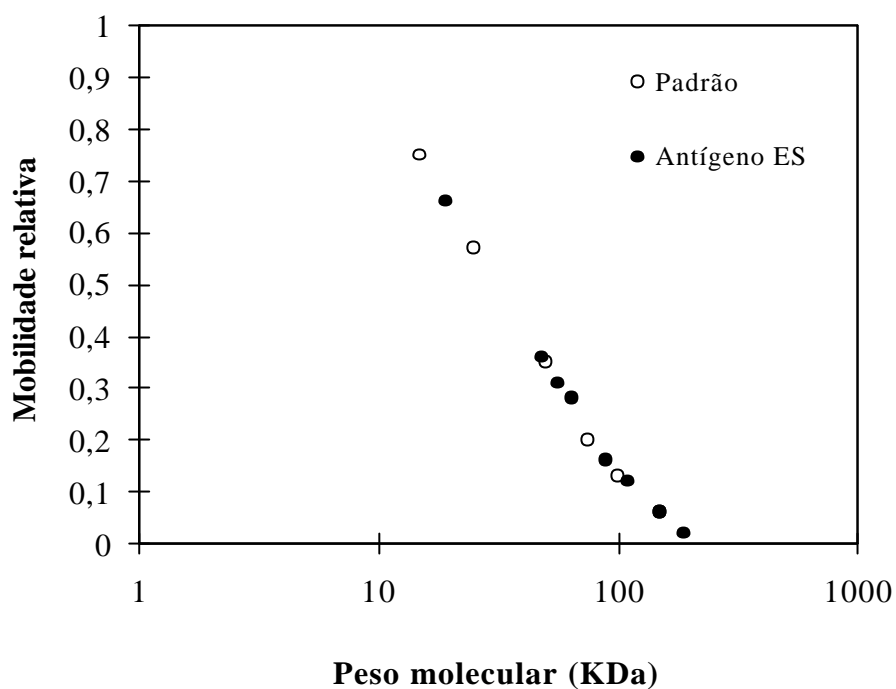


FIGURA 6 – Mobilidade relativa do antígeno ES em relação ao peso molecular (KDa) da amostra padrão (Sigma, M-0671). Informação obtida de um minigel de SDS-PAGE a 12% corado com azul de Coomassie.

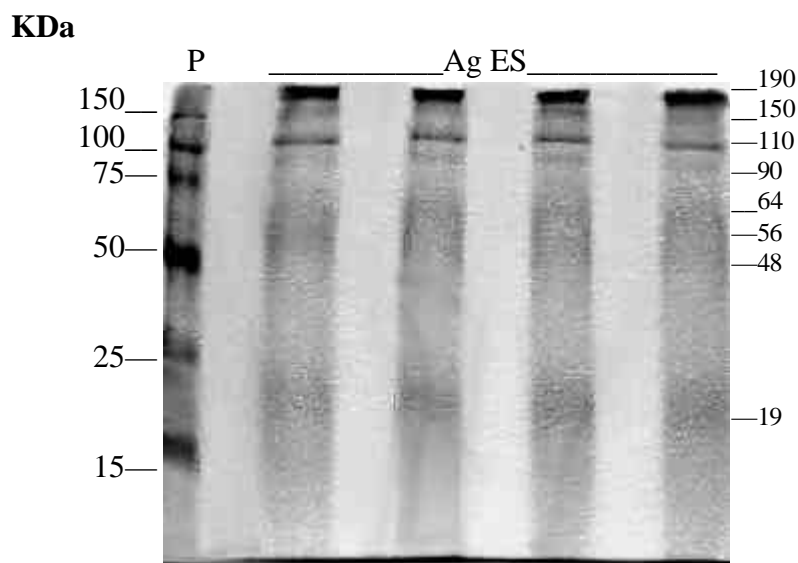


FIGURA 7 – SDS-PAGE a 12% do antígeno ES de *T. vitulorum* revelando pesos moleculares de 190, 150, 110, 90, 64, 56, 48 e 19 KDa corado por azul de Coomassie na concentração de 54 μ g. (P) Pesos moleculares da amostra padrão (Sigma, M-0671).

3. “Western blot” (WB)

Após a transferência das frações de antígenos para membrana de nitrocelulose, a detecção das frações antigênicas foi pelo uso de anticorpos anti-*T. vitulorum* (“pool” de soros-ímmes de bezerros naturalmente infectados, de búfalas adultas no dia do parto, do colostro e de soros-ímmes de camundongos imunizados experimentalmente). O anticorpo primário (soro-ímmes dos búfalos) reconheceu as proteínas de interesse enquanto o anticorpo secundário (conjugado à fosfatase alcalina) reconheceu a porção Fc do anticorpo primário. O anticorpo secundário, por sua vez, reagiu com o substrato enzimático (BCIP/NBT) que resultou num precipitado de cor púrpura-escuro, revelando as bandas de proteínas.

Quase todas as bandas protéicas separadas pelo SDS-PAGE foram identificadas pelos soros-ímmes específicos através do WB (Tabela 7 e 8, Figuras 8, 9 e 10). Analisando, primeiramente o soro de búfalas adultas no dia do parto (referência positiva), todas as bandas foram reconhecidas frente às imunoglobulinas anti-Pe e anti-ES, porém seis bandas não foram reconhecidas quando analisadas pelo antígeno Ex (11,2, 13,3, 16,5, 22, 25 e 32 KDa). Em seguida, quando se analisou o soro de bezerros búfalos antes de receberem o colostro (referência negativa), pôde-se observar que não houve reconhecimento de nenhuma banda dos três antígenos (Tabela 7, Figura 8). Por outro lado, o colostro coletado no dia do parto apresentou a mesma reatividade observada no soro das búfalas aos três antígenos.

Os anticorpos anti-*T. vitulorum* presentes nestes soros foram capazes de reconhecer as bandas de 165, 112 e 88 KDa do antígeno Pe e as frações de 96, 82 e 68 KDa do antígeno Ex, em todos os soros. Porém, com maior frequência as bandas de 76, 58, 14,2 e 11,5 KDa para o antígeno Pe; as de 53 e 43 KDa para o antígeno Ex e as bandas de 190, 150, 110 e 19 KDa para o antígeno ES. Contudo, as bandas 38 e 31 KDa para o Pe; a de 25 KDa para o Ex e por último as de 90, 64, 56 e 48 KDa para o ES, foram ocasionalmente reconhecidas. Finalmente, as bandas de baixo peso molecular (32, 22, 16,5, 13,3 e 11,2 KDa) do antígeno Ex não se mostraram antigênicas com os soros testados (Tabela 7).

O soro de bezerros búfalos com um dia de vida, mas após receberem o colostro, reconheceu bandas protéicas similares àquelas reveladas pelo colostro e pelo soro das búfalas adultas, frente aos três antígenos. Porém, aqui foi verificada pela primeira vez a presença da reatividade da única banda de 25 KDa.

Os anticorpos dos soros de bezerros búfalos durante a fase de aparecimento e ascensão reagiram com todas as bandas dos antígenos Pe e ES, repetindo assim o mesmo resultado dos soros das búfalas adultas no dia do parto e do colostro, além dos bezerros com um dia de idade, após receberem o colostro. O mesmo foi verificado com o antígeno Ex, porém a banda de 25 KDa desapareceu neste grupo (Tabela 7, Figura 9). Já nas fases de pico e declínio, os anticorpos sorológicos reagiram com apenas três bandas dos antígenos Pe (165, 112 e 88 KDa) e Ex (96, 82 e 68 KDa), porém com o antígeno ES, reagiram com cinco bandas (190, 150, 110, 56 e 19 KDa) no pico e quatro (190, 150, 110 e 19 KDa) no declínio. Na fase de ausência, enquanto que os antígenos Pe e Ex continuaram a ser reconhecidos pelos anticorpos (três bandas), nenhuma banda do antígeno ES foi detectada (Tabela 7 e Figura 9).

Com relação aos soros dos camundongos imunizados pelos antígenos Pe, Ex e ES verificou-se que os anticorpos sorológicos anti-Pe, anti-Ex e anti-ES reagiram com a maioria das bandas protéicas com seus respectivos antígenos homólogos. Como por exemplo, no soro imune anti-Pe, foi possível verificar o reconhecimento da maioria das bandas do antígeno Pe, porém verificou-se também reação cruzada com as bandas de 96, 82 e 68 KDa do antígeno Ex, mas nenhuma do antígeno ES. Além disso, os soros imunes contendo os anticorpos anti-Ex e anti-ES por sua vez, reagiram com a maioria das bandas dos antígenos ES e Ex, respectivamente. Porém, o anti-Ex reagiu somente com quatro bandas do antígeno Pe (165, 112, 88 e 76 KDa) e o anti-ES, por outro lado, reagiu com sete bandas do antígeno Pe (165, 112, 88, 76, 58, 14,2 e 11,5 KDa) (Tabela 8 e Figura 10). Entretanto, as bandas de 165, 112, 14,2 e 11,5 KDa do antígeno Pe e a banda de 96 KDa do antígeno Ex, foram reveladas no soro de camundongos não imunizados (grupo do controle), mesmo que, fracamente reativos.

TABELA 7 – Caracterização dos antígenos Pe, Ex e ES pelo SDS-PAGE e análise pelo WB.

SDS-PAGE (KDa)			Bandas detectadas no Western blot caracterizadas por pesos moleculares (KDa)																							
			Referência positiva*			Referência negativa**			Colostro***			Soros de bezerros búfalos naturalmente infectados														
												Um dia (após receber o colostro)			Aparecimento e ascensão			Pico			Declínio (expulsão)			Ausência (autocura)		
Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES			
165	96	190	165	96	190	-	-	-	165	96	190	165	96	190	165	96	190	165	96	190	165	96	190	165	96	-
112	82	150	112	82	150	-	-	-	112	82	150	112	82	150	112	82	150	112	82	150	112	82	150	112	82	-
88	68	110	88	68	110	-	-	-	88	68	110	88	68	110	88	68	110	88	68	110	88	68	110	88	68	-
76	53	90	76	53	90	-	-	-	76	53	90	76	53	90	76	53	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	43	64	58	43	64	-	-	-	58	43	64	58	43	64	58	43	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	32	56	38	-	56	-	-	-	38	-	56	38	-	56	38	-	56	-	-	56	-	-	-	-	-	-
31	25	48	31	-	48	-	-	-	31	-	48	31	25	48	31	-	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14,2	22	19	14,2	-	19	-	-	-	14,2	-	19	14,2	-	19	14,2	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-	-
11,5	16,5		11,5	-		-	-	-	11,5	-		11,5	-		11,5	-		-	-		-	-		-	-	
	13,3			-		-	-	-		-			-			-		-	-		-	-		-	-	
	11,2			-		-	-	-		-			-			-		-	-		-	-		-	-	

- Não apresentou reatividade.

* Soro de búfalas adultas naturalmente infectadas (no dia do parto).

** Soro de bezerros búfalos naturalmente infectados antes de receber o colostro.

*** Colostro de búfalas adultas naturalmente infectadas (no dia do parto).

TABELA 8 – Caracterização dos antígenos Pe, Ex e ES pelo SDS-PAGE e análise pelo WB utilizando-se soros imunes de camundongos imunizados experimentalmente com os antígenos Pe, Ex e ES de *T. vitulorum*.

SDS-PAGE (KDa)			Bandas detectadas no Western blot caracterizadas por pesos moleculares (KDa)											
			Soros imunes de camundongos imunizados											
			Controle			Anti-Pe			Anti-Ex			Anti-ES		
Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES	Pe	Ex	ES
165	96	190	165	96	-	165	96	-	165	96	190	165	96	190
112	82	150	112	-	-	112	82	-	112	82	150	112	82	150
88	68	110	-	-	-	88	68	-	88	68	110	88	68	110
76	53	90	-	-	-	76	-	-	76	53	90	76	53	90
58	43	64	-	-	-	58	-	-	-	43	64	58	43	64
38	32	56	-	-	-	-	-	-	-	-	56	-	-	56
31	25	48	-	-	-	-	-	-	-	-	48	-	-	48
14,2	22	19	14,2	-	-	14,2	-	-	-	-	19	14,2	-	19
11,5	16,5		11,5	-		11,5	-		-	-		11,5	-	
	13,3			-			-			-			-	
	11,2			-			-			-			-	

- Não apresentou reatividade.

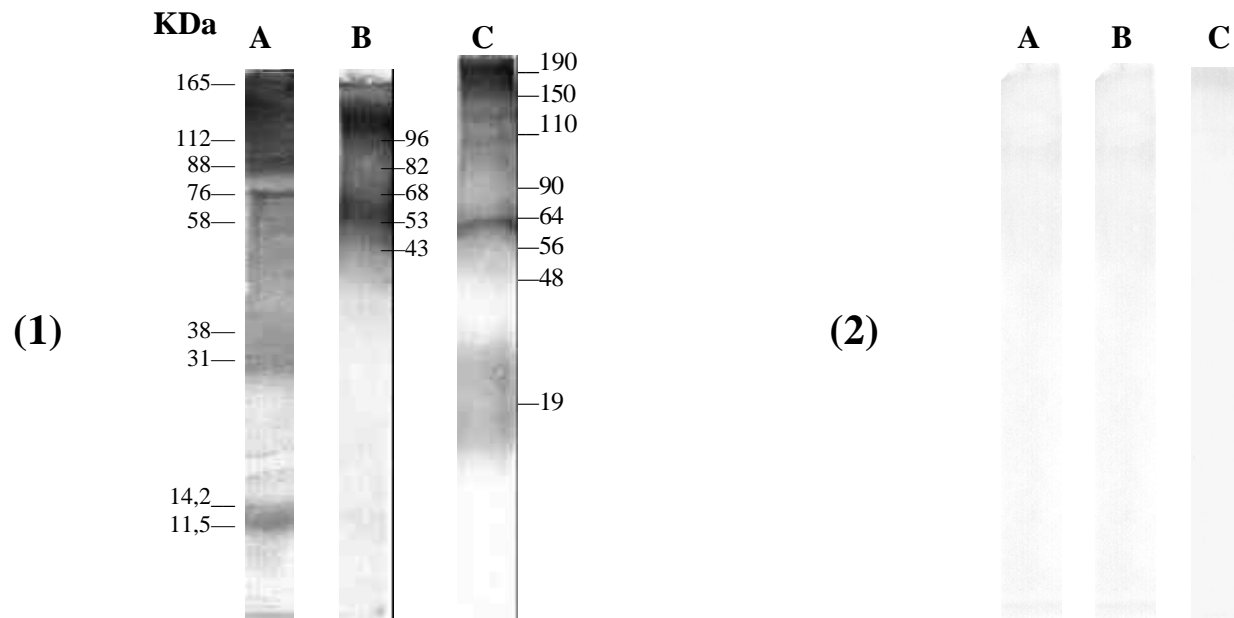


FIGURA 8 – Análise pelo WB do (1) “pool” dos soros de búfalas adultas no dia do parto (referência positiva) e (2) “pool” de soros de bezerros búfalos com um dia pós-parto antes de receberem o colostro (referência negativa). (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) Antígeno Ex (109,6 µg) e (C) Antígeno ES (54 µg).

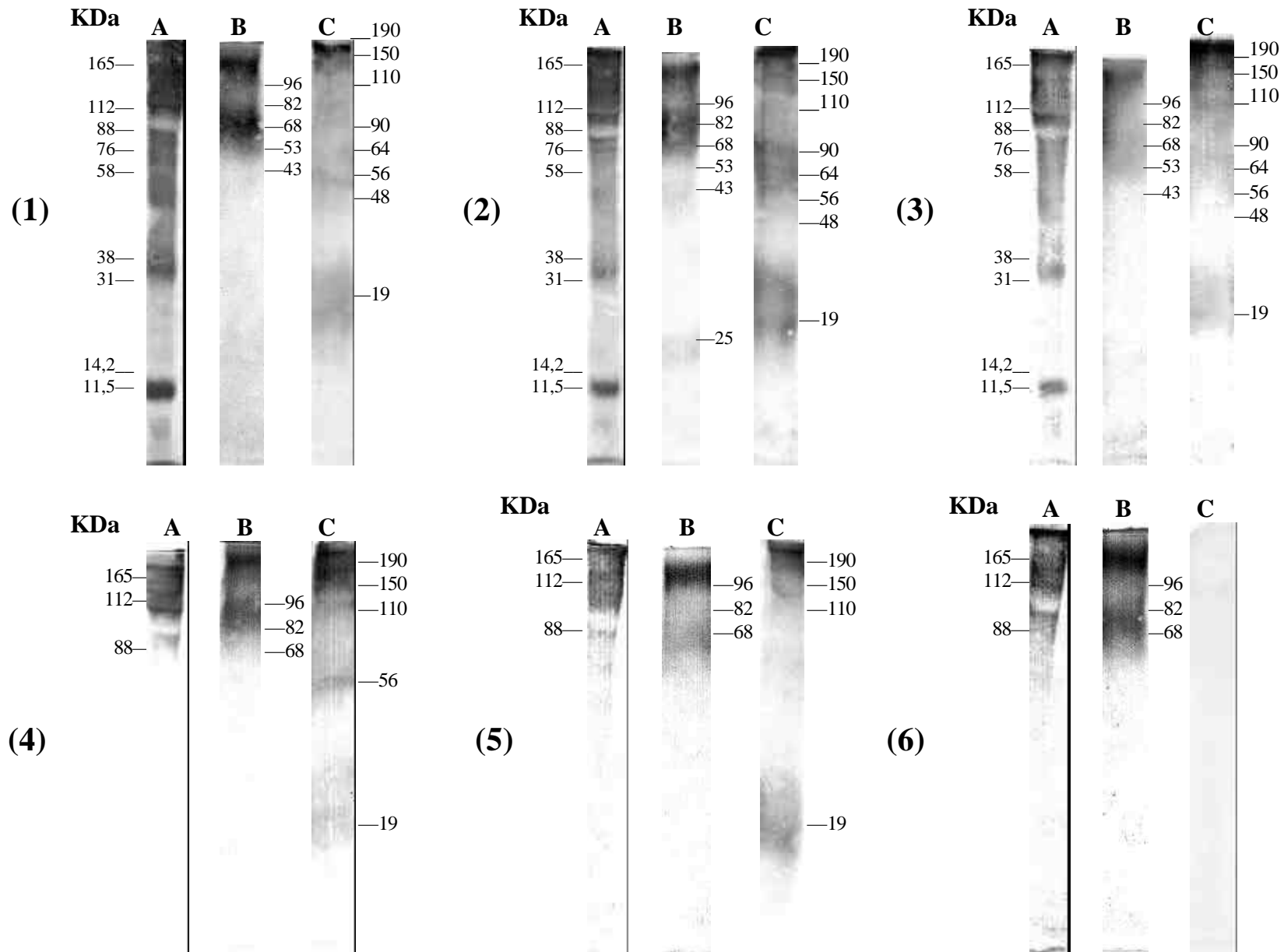


FIGURA 9 – Análise pelo WB do (1) “pool” de colostro de búfalas no dia do parto e “pool” de soros imunes de bezerros búfalos: (2) com um dia de idade após receberem o colostro, (3) aparecimento e ascensão, (4) pico, (5) declínio e (6) ausência. (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) antígeno Ex (109,6 µg) e (C) antígeno ES (54 µg).

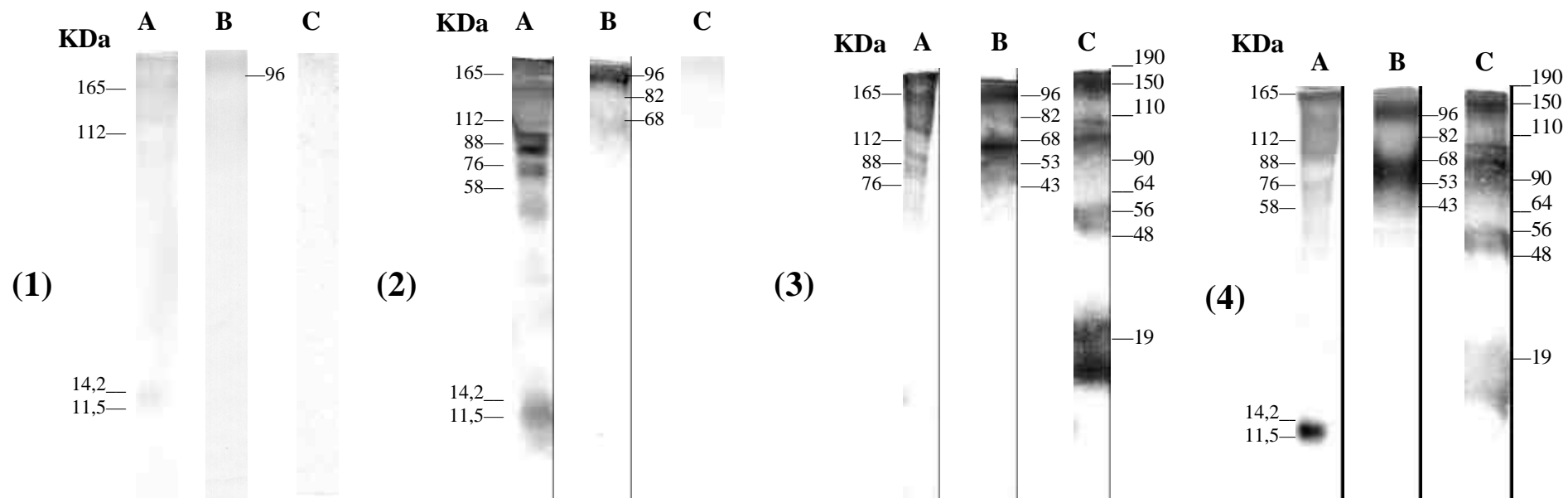


FIGURA 10 – Análise pelo WB do “pool” de soros imunes de camundongos de quatro grupos distintos: (1) controle, (2) anti-Pe, (3) anti-Ex e (4) anti-ES. (A) Antígeno Pe (41,1 µg), (B) antígeno Ex (109,6 µg) e (C) antígeno ES (54 µg).

DISCUSSÃO

1. Parâmetros parasitológicos

Através dos exames coprológicos, pôde-se observar que os bezerros búfalos iniciaram eliminação de ovos nas fezes a partir de 16 dias, demonstrando uma precocidade da infecção por *T. vitulorum* já constatada por outros autores (TONGSON, 1971; WARREN, 1971; CHAUHAN et al., 1974; STARKE et al., 1983; ROBERTS, 1990a e STARKE-BUZETTI et al. 2001). Um dos motivos que justificam a precocidade desta infecção é a aquisição das larvas deste parasita através do colostro materno (WARREN, 1971; STARKE et al., 1992; ROBERTS et al., 1990 e SOUZA, 2001). No presente experimento, verificou-se que o pico da oviposição ocorreu em torno de 40 – 47 dias de idade quando a contagem de OPG começou a declinar devido à resistência adquirida. Esta queda foi em decorrência da expulsão natural dos helmintos pelos bezerros búfalos (CHAUHAN et al., 1974; STARKE et al., 1983; NEVES, 2001 e SOUZA, 2001). O OPG tendeu a nulo a partir de 117 dias, mesmo quando mantidos em locais contaminados por ovos e larvas infectantes, confirmando o fato de não haver reinfecção intestinal. Esta autocura espontânea foi estudada recentemente por NEVES (2001) e SOUZA (2001).

Pelos exames coprológicos realizados seqüencialmente verificou-se que os bezerros búfalos apresentaram uma contagem média de 8.525 OPG no pico da oviposição. AKHTAR et al. (1982) consideraram 5.000 OPG como infecção leve, 5.000 a 10.000 OPG como infecção moderada e acima de 10.000 OPG como infecção grave. Portanto, os bezerros búfalos, durante o pico, encontravam-se com infecção moderada por *T. vitulorum*. BARUAH et al. (1980) detectaram casos clínicos de diarréia e desidratação com 2.700 e 16.000 OPG e casos de toxemias com 31.000 e 66.000 OPG.

No entanto, os bezerros búfalos do presente trabalho, apresentaram diarreia somente no período de expulsão do parasita (a partir de 118 dias).

2. Caracterização antigênica por SDS-PAGE

A caracterização dos antígenos de *T. vitulorum* é essencial para entender a relação hospedeiro-parasita e é especificamente importante no caso da migração tecidual em búfalos. Neste estudo foram observados componentes antigênicos no antígeno Pe com pesos moleculares aparentes de 11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa e para o antígeno Ex 11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82, e 96 KDa demonstrando uma ampla variação de pesos moleculares obtidas de análise de um gel na concentração de 12% de moléculas desnaturadas, porém não excluiu a possibilidade de revelar mais componentes em concentrações diferentes como por exemplo, utilizando gradientes de concentração, ou mesmo pela coloração por nitrato de prata.

Os resultados aqui apresentados têm similaridade com os achados de outros autores quando relataram que o material ES de larvas infectantes de *T. canis* é uma mistura protéica complexa com um amplo alcance de pesos moleculares (MAIZELS et al. 1984, BADLEY et al. 1987 e ZARNOWSKA & JASTRZEBSKA 1994). A identificação protéica do antígeno ES de larvas infectantes de *T. vitulorum* revelou proteínas de 19, 48, 56, 64, 90, 110, 150 e 190 KDa, enquanto que MAIZELS et al. (1984) encontraram frações protéicas variando de 32-400 KDa (32, 55, 70, 120 e 400 KDa) detectados no material excretor-secretor de *T. canis*; portanto, três bandas protéicas se mostraram similares ao *T. vitulorum* (56, 64 e 110 KDa). Por outro lado, ZARNOWSKA & JASTRZEBSKA (1994) encontraram 15 frações protéicas do antígeno ES de *T. canis* (19-200 KDa) revelando similaridades nas bandas de 56 e 64 KDa. Algumas diferenças qualitativas observadas sugerem diferenças das espécies pesquisadas e diferentes métodos adotados na preparação dos antígenos e na técnica do SDS-PAGE. Além disto, mesmo pequenas diferenças nas condições eletroforéticas, bem como concentrações e quantidade de proteínas separadas podem também afetar os resultados finais.

A concentração protéica do antígeno ES estimada foi de 10 η g/dia, por larva infectante de *T. vitulorum*, acima do que SAVIGNY (1975) estimou (9 a 10 μ g/dia) e MEGHJI & MAIZELS (1986) estimaram (200 μ g/dia) ambos pela cultura de *T. canis*.

No entanto, foi similar ao resultado de BADLEY et al. (1987), 8 ηg/dia, também em *T. canis*. A possível razão pelo qual houve a diferença de milhares de vezes em relação a SAVIGNY (1975) no rendimento de proteína pode ter sido devida ao método de manutenção das larvas. SAVIGNY (1975) utilizou o meio essencial mínimo de “Eagles” com sal de “Hanks”, ao passo que utilizamos meio de cultura completo RPMI-1640 com HEPES tamponado. Outra possível razão seria a utilização de espécies diferentes apesar do mesmo gênero do parasita.

3. Caracterização antigênica pelo WB de soro e colostro de búfalas adultas naturalmente infectadas no dia do parto

A reação dos componentes protéicos dos antígenos de *T. vitulorum* (anti-Pe, anti-Ex, anti-ES) testados com os anticorpos dos soros imunes das búfalas adultas seguiu o reconhecimento pelo WB.

O soro de búfalas adultas no dia do parto (referência positiva) reconheceu quase todas as frações dos antígenos detectadas na eletroforese. No entanto, a reação frente ao antígeno Ex não revelou as frações protéicas de baixos pesos moleculares (11,2 a 32,0 KDa). À exceção do antígeno Ex, verificado na presente pesquisa, estes resultados foram condizentes com os de SOUZA (2001) que verificou altos níveis de anticorpos anti-Pe, anti-Ex e anti-ES presentes neste período. Estes resultados sugerem que nesse período, as larvas que estariam em hipobiose poderiam estar migrando para a glândula mamária, estimulando o sistema imunológico, conforme ROBERTS (1990b) que mencionou a migração das larvas de *T. vitulorum* do fígado para a glândula mamária das búfalas, oito dias antes do parto. Apesar das búfalas apresentarem níveis elevados de anticorpos anti-*T. vitulorum* não foram suficientes para impedir que as larvas fossem eliminadas, via colostro. Além disso, altos níveis de anticorpos nos soros de búfalas no periparto também foram mencionados por RAJAPAKSE et al. (1994), STARKE-BUZETTI et al. (2001) e SOUZA (2001) através do método ELISA, e por BANERJEE et al. (1998), pela técnica de hemoaglutinação indireta e imunoeletroforese.

Resultado semelhante foi observado quando utilizou o colostro de búfalas no dia do parto, frente aos antígenos Pe, Ex e ES. Os anticorpos revelaram as mesmas frações protéicas verificadas no soro das búfalas adultas, no mesmo período pós-parto, demonstrando a passagem dos anticorpos para o colostro, conforme verificado por RAJAPAKSE et al. (1994). O colostro, além de transferir imunoglobulinas para os

bezerros, também é considerado uma via de transmissão de larvas infectantes (MIA et al., 1975; STARKE et al., 1983; ROBERTS et al., 1990 e STARKE et al., 1992), e estas imunoglobulinas não protegeram os animais contra a aquisição das larvas.

4. Caracterização antigênica pelo WB de soros imunes de bezerros búfalos naturalmente infectados por *T. vitulorum* em diferentes fases

Analisando-se a reação das amostras de soros de bezerros búfalos com um dia de idade, após receberem os anticorpos via colostro, nota-se que quase todas as frações protéicas foram reconhecidas pelo WB, além de ter havido o aparecimento de uma banda adicional de 25 KDa, frente ao antígeno Ex. Desta forma, neste grupo, todas as bandas detectadas pelos anticorpos anti-Pe, anti-Ex e anti-ES foram similares àquelas detectadas no colostro, indicando a passagem e a absorção das imunoglobulinas do colostro pelos bezerros búfalos, já dentro das primeiras 24 horas de vida. Por outro lado, os soros de referência negativa, por serem provenientes de bezerros búfalos que não mamaram o colostro, conseqüentemente, não apresentaram nenhuma banda no WB. Estes dados mais uma vez, confirmaram a transferência de imunoglobulinas IgG do colostro para os soros de bezerros búfalos. Dados semelhantes foram obtidos por RAJAPAKSE et al. (1994); STARKE-BUZETTI et al. (2001) e SOUZA (2001), através do ELISA.

Além disso, nos soros de bezerros na fase de aparecimento e ascensão, verificou-se a mesma freqüência de reatividade com as bandas dos três antígenos. Porém, a banda de 25 KDa já não mais foi detectada em qualquer outra fase da infecção intestinal, sugerindo aqui uma possível reação cruzada ou mesmo algum tipo de falha no processamento da técnica. Os anticorpos, dos soros de bezerros búfalos, um dia após mamarem o colostro e dos da fase de aparecimento e ascensão, reagiram com as mesmas bandas protéicas dos três antígenos. Além disso, STARKE-BUZETTI et al. (2001) observaram, pelo ELISA, níveis máximos de anticorpos anti-Ex em animais com até 15 dias de idade, e então a partir daí, estes anticorpos começaram a sofrer uma queda na concentração. Já SOUZA (2001) observou níveis máximos de reatividade até 45 dias de idade para o antígeno Pe e ES. Na presente pesquisa, durante o período compreendido entre um a 39 dias, não houve variação na quantidade de bandas reveladas pelo WB, em relação aos dados do soro e do colostro da búfalas.

As imunoglobulinas anti-Pe, anti-Ex e anti-ES que ainda encontrava-se em concentrações altas até à fase de pico (40 - 47 dias de idade) começaram a declinar a partir de então, especialmente as bandas de baixos pesos moleculares, que começaram a desaparecer pelo WB. O mesmo foi verificado durante a fase de expulsão do parasita (48 - 117 dias de idade). Este fato sugere que os anticorpos que ainda restaram foram proeminentes do colostro porém, a concentração destes anticorpos declinou progressivamente, como também verificados por STARKE-BUZETTI et al. (2001) e SOUZA (2001) que reportaram esta queda em relação aos níveis de anticorpos sorológicos, nas fases de pico e declínio, detectados pelo ELISA. No entanto, pode-se ressaltar aqui a similaridade no reconhecimento das bandas protéicas que ainda permaneceram: as de 88, 112 e 165 KDa do antígeno Pe, as bandas de 68, 82 e 96 KDa do antígeno Ex e as bandas de 19, 110, 150, e 190 KDa do antígeno ES. Nesse ponto, pode-se levantar a seguinte hipótese: os anticorpos (IgG) recebidos pelo colostro apesar de não terem protegido os animais de adquirirem a infecção poderiam estar participando do processo de expulsão dos parasitas adultos do lúmen intestinal. WAKELIN (1996) assinalou vários mecanismos imunológicos e inflamatórios que podem estar envolvidos na resposta protetora contra os parasitas do lúmen intestinal. Desta forma, as imunoglobulinas IgG provenientes do soro poderiam alcançar o lúmen intestinal e apesar de sua proteólise, a porção Fab da IgG poderia permanecer intacta e funcional por algum tempo e apresentar ação no local do parasitismo (WAKELIN, 1996). Porém, a resposta imune envolve um conjunto de reações complexas com participação celular (enterócitos, linfócitos, eosinófilos, mastócitos e macrófagos) e mediadores inflamatórios. Além disso, os componentes antigênicos liberados no lúmen intestinal durante o crescimento, muda, maturação, reprodução, alimentação e excreção dos parasitas adultos e jovens podem constituir uma constante estimulação da mucosa e conseqüentemente desencadear uma resposta imune protetora.

Por último, analisando-se a fase de ausência ou autocura (223 - 238 dias de idade), que representou o período de três a quatro meses de ausência de ovos de *T. vitulorum* nas fezes dos bezerros, pôde-se verificar que as frações presentes reveladas nesta fase foram similares às da fase anterior (declínio ou expulsão do parasita). Porém, não se observou reatividade a qualquer banda do antígeno ES. Estes resultados, podem sugerir que as imunoglobulinas IgG anti-Pe e anti-Ex presentes nos soros dos bezerros búfalos, durante as diferentes fases da infecção intestinal, reconheceram com maior intensidade e freqüência as bandas protéicas de alto peso molecular nos três antígenos

estudados (68 – 190 KDa). Analisando-se os resultados de SOUZA (2001), a respeito da resposta imune humoral pelo ELISA, de bezerros búfalos com idades superiores a 150 dias, verificou-se uma elevação nos níveis de anticorpos, principalmente anti-Pe e anti-Ex, que permaneceram em leve ascensão até 365 dias. Já a concentração do anti-ES, apesar de ter apresentado ligeira elevação a partir de 150 dias, esta não ultrapassou a linha de corte. Comparando-se ainda os resultados de SOUZA (2001) com os da presente pesquisa, pode-se sugerir que as bandas de alto peso molecular ainda presentes nos grupos de animais que não se encontravam com parasitas adultos no trato intestinal, podem ter sido decorrentes de anticorpos produzidos ativamente. Como nesta fase, não se detectaram ovos nas fezes dos bezerros búfalos, estes anticorpos, possivelmente, foram decorrentes de uma resposta imunologicamente mediada pelas larvas migratórias no intestino para os demais tecidos (fígado, pulmão, etc). Como os bezerros búfalos permaneceram na mesma pastagem contaminada com ovos infectantes, constantemente eliminados pelas fezes dos animais parasitados, deduz-se a possibilidade de contaminação. Como os animais, com 223 a 238 dias de idade (fase de ausência ou autocura) apresentavam-se com OPG nulo a partir de 117 dias, concluiu-se que as reações imunológicas adquiridas durante o período de pico e expulsão contribuíram para que os animais se tornassem resistentes às reinfecções intestinais. Resta, no entanto, conhecer se estes anticorpos continuarão a ser produzidos ativamente contra as larvas migrantes, principalmente, nas novilhas em fase reprodutiva.

5. Especificidade antigênica

A especificidade antigênica dos antígenos Pe, Ex e ES foi testada usando-se soros hiperimunes de camundongos inoculados experimentalmente com estes antígenos, pelo WB. As reações obtidas destes soros imunes (anti-Pe, anti-Ex e anti-ES) com seus respectivos antígenos (reação homóloga) e com antígenos diferentes (reação heteróloga) adequaram-se ao esperado.

O soro anti-Pe, reconheceu quase todas as bandas do antígeno Pe, permanecendo ausentes somente as bandas de 38 e 31 KDa reveladas no SDS-PAGE. Houve reação cruzada com as bandas de 96, 82 e 68 KDa do antígeno Ex, mas não com ES. Entretanto, verificou-se no soro de camundongos não imunizados (grupo controle), a presença das bandas de 165, 112, 14,2 e 11,5 KDa do antígeno Pe e a banda específica de 96 KDa do antígeno Ex, mesmo que fracamente reativos, sugerindo aqui, a

possibilidade de reação cruzada com uma possível infecção parasitária intestinal por estes animais.

Em relação aos grupos anti-Ex e anti-ES, pôde-se verificar pouca especificidade antigênica, porém tiveram comportamento similar entre si. No soro anti-Ex, além do reconhecimento das bandas de pesos moleculares entre 43 a 96 KDa de seu homólogo, houve reconhecimento de oito bandas do heterólogo ES (19 – 190 KDa) e quatro bandas do heterólogo Pe (76 – 165 KDa). O mesmo acontecendo para o grupo anti-ES com seu homólogo, reconhecendo todas suas bandas (19 – 190 KDa) porém, cinco bandas do heterólogo Ex e sete bandas do heterólogo Pe (11,5 – 165 KDa).

Outros autores verificaram reações cruzadas principalmente nos estudos de antígenos de larvas infectantes de *T. canis* em relação às outras espécies filogeneticamente similares, como por exemplo, ASHOUR et al. (1995) com *Toxascaris leonina*, *Parascaris equorum*, *Toxocara canis* e *T. vitulorum*, sugerindo que este último apresentou-se mais divergente das espécies e MASSRY et al. (1999) com *T. canis* e *Toxascaris leonina*. Além disso, ABDEL-RAHMAN et al. (2000) verificaram reações cruzadas entre *T. vitulorum*, *Moniezia* e *F. gigantica* com seus respectivos anti-soros produzidos em coelhos e HASSANAIN et al. (2000) encontraram também reações cruzadas entre *F. gigantica* e *T. vitulorum* nos seus respectivos anti-soros produzidos em coelhos. No entanto, na presente pesquisa, ainda não foi possível avaliar a reação cruzada com os antígenos de *Strongyloides papillosus*. Pois, apesar dos bezerros encontrarem-se parasitados por este nematódeo, no período de 15 a 170 dias de idade, esta infecção foi considerada de baixa intensidade (OPG médio de 800, no pico da oviposição). Além de deste, *Cooperia punctata* e *C. pectinata* também coabitaram, a partir de 30 dias de idade, o trato intestinal dos bezerros búfalos, mas novamente em baixíssima intensidade (50 a 200 OPG).

Analisando separadamente os grupos de camundongos imunizados, podemos verificar que somente as bandas de alto peso molecular (88-165 KDa) do antígeno Pe com o soro homólogo anti-Pe, permaneceram em todos os soros analisados pelo WB, mesmos nos grupos anti-Ex e anti-ES dos camundongos, ou seja, reconhecidos pelos soros heterólogos. Sugere-se aqui, que estas bandas detectadas pelo soro e pelo colostro devam ser isoladas e pesquisadas para verificar o papel destas proteínas na proteção imunológica, principalmente das búfalas no período que antecede o parto, na tentativa de interferir no ciclo biológico durante a fase migratória das larvas pelo tecido materno. Desta forma, evitar-se-ia que os bezerros adquirissem larvas oriundas do colostro

infectado. O mesmo pode ser estendido para as bandas de 68-96 KDa do antígeno Ex e as bandas de 110-190 KDa do antígeno ES. Apesar de verificar-se que esta última já não foi mais reconhecida na fase de ausência da oviposição. Tentativas de imunização já foram realizadas com animais de laboratório, por exemplo, BARRIGA & OMAR (1992) isolaram antígenos de ovos infectantes de *T. vitulorum*, imunizaram coelhos e detectaram várias bandas, de diferentes pesos moleculares pelo WB, em diferentes fases experimental e concluíram que, possivelmente, o antígeno de 41 KDa poderia ser o candidato para futuros estudos em proteção imunológica. Também, AMERASINGHE et al. (1992) que imunizando camundongos com diferentes antígenos de *T. vitulorum* (de larvas e de adultos) verificaram um alto grau de proteção imunológica, principalmente, quando o antígeno Pe do adulto (100%), ES (> 92%) e Ex (82%) da larva, foram utilizados. Resta, no entanto, investigar o papel imunogênico destes antígenos no hospedeiro habitual, o búfalo.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Os antígenos Pe, Ex e ES demonstraram mobilidade eletroforética no SDS-PAGE revelando nove (11,5, 14,2, 31, 38, 58, 76, 88, 112 e 165 KDa), onze (11,2, 13,3, 16,5, 22, 25, 32, 43, 53, 68, 82, e 96 KDa) e oito (19, 48, 56, 64, 90, 110, 150 e 190 KDa) bandas de pesos moleculares protéicos distintos, respectivamente.
- Os antígenos Pe, Ex e ES separados pelo SDS-PAGE e testados pelo WB, reagiram com soros e colostros de búfalas no dia do parto, com soros de bezerros búfalos em diferentes fases da infecção intestinal por *T. vitulorum* e com soros de camundongos imunizados com estes respectivos antígenos.
- As bandas protéicas de alto peso molecular (68 – 190 KDa) dos antígenos Pe, Ex e ES foram reconhecidas pela maioria dos soros analisados pelo WB.
- Há ocorrência de reação cruzada entre os soros de camundongos imunizados experimentalmente com *T. vitulorum*, frente aos antígenos Pe, Ex e ES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, E.H., ABDEL-MEGEED, K.N., HASSANAIN, M.A. Structural characterization and immunolocalization of egg antigens cross-react with *Toxocara vitulorum*, *Fasciola gigantica* and *Moniezia expansa* mature flukes. **Journal of the Egyptian Society Parasitology**, v.30, n.2, p.581-91, 2000.

ABO-SHEHADA, M.N., AL-ZUBAIDY, B.A., HERBERT, I.V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.38, n.4, p.289-98, 1991.

AKHTAR, M.S., CHATTHA, M.I., CHAUDHRY, A.H. Comparative efficacy of santonin and piperazine against *Neoascaris vitulorum* in buffalo calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.5, n.1, p.71-6, 1982.

AMERASINGHE, P.H., RAJAPAKSE, R.P., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. **Parasitology Research**, Belfast, v.78, n.8, p.643-7, 1992.

AMERASINGHE, P.H., VASANTHATHILAKE, V.W., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. Periparturient reduction in buffalo of mitogen-induced lymphocyte proliferation and antibody to *Toxocara vitulorum*. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 26, n.2, p.109-16, 1994.

ASHOUR, A.A., TAHA, H.A., MOHAMMAD, A.el-H. Comparative SDS-PAGE protein patterns of four ascaridid nematodes. **Journal of the Egyptian Society Parasitology**, v.25, n.3, p.761-7, 1995.

BADLEY, J.E., GRIEVE, R.B., BOWMAN, D.D., GLICKMAN, L.T., ROCKEY, J.H. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: physico-chemical characterization and antibody recognition. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.73, n.3, p.593-600, 1987.

BANERJEE, D.P., BARMAN ROY, A.K., SANYAL, P.K. Public health significance of *Neoascaris vitulorum* larvae in buffalo milk samples. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.69, n.6, p.1124, 1983.

BANERJEE, P.S., BHATIA, B.B., GARG, S.K. Comparative evaluation of IHA and CIEP in the diagnosis of *Toxocara vitulorum* in pregnant cows and buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v.30, n.4, p.253-6, 1998.

BARRIGA, O.O., OMAR, H.M., Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.33, n.3, p.249-60, 1992.

BARUAH, P.K., et al. Treatment trials and correction of electrolyte imbalance caused by *Neoascaris vitulorum* in buffalo calves. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.4, p.76-8, 1980.

BLAKE, M.S., JOHNSTON, K.H., RUSSELL-JONES, G.J., GOTSCHLICH, E.C. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. **Analytical Biochemistry**, New York, v.136, n.1, p.175-179, 1984.

BOLLAG, D.M., EDELSTEIN, S.J. Gel electrophoresis under denaturing conditions. In:____. **Protein Methods**. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1991.

CARRILLO, M.S., BARRIGA, O.O. Antihelmintic effect of levamisole hydrochloride or ivermectin on tissue toxocariasis of mice. **American Journal Veterinary Research**, v.48, n.2, p.281-4, 1987.

CHAUHAN, P.P.S., BHATIA, B.B., PANDE, B.P. Incidence of gastro-intestinal nematodes in buffalo and cow at State livestock farms in Uttar Pradesh. **Indian Journal Animal Science**, v.43, p.216-9, 1974.

DAS, K.M., SINGH, G.B. Calf ascariasis in India. A nine years' survey with special reference to "Hetrazan". **The British Veterinary Journal**, London, v.111, p.342-7, 1955.

GAUTAM, O.P., MALIK, P.D., SINGH, D.K. *Neoascaris vitulorum* larvae in the colostrum of buffaloes. **Current Science**, Bangalore, v.45, p.350, 1976.

GUPTA, G.C., JOSUL, B.P., RAI, P. Some aspects of biochemical studies in calf disease ascariasis and scour. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v.53, p.438-41, 1976.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v.48, n.2, p.422-7, 1972.

HASSANAIN, M.A., MAHMOUND, M.S., el-EZZ, N.M. Identification of mouth part antigens of *Fasciola gigantica* and *Toxocara vitulorum* and its molecular targets recognized by homologous and heterologous adult anti-sera against adult. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.30, n.3, p.855-69, 2000.

KAYES, S.G; OAKS, J.A. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.93, n.2, p.277-94, 1978.

KENNEDY, M.W., QURESHI, F., FRASER, E.M., HASWELL-ELKINS, M.R., ELKINS, D.B., SMITH, H.V. Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis*. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.75, n.3, p.493-500, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.259, p.680-5, 1970.

LÁU, H.D. Doenças dos bezerros. In:____. **Doenças em búfalos no Brasil: diagnósticos, epidemiologia e controle**. 1.ed. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. p.23-56.

LOMBARDI, S., VEGNI-TALLURI, M., BANCHIERI, L., ESPOSITO, F. The *in vitro* adherence of murine eosinophils, neutrophils and non-induced and induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae). **International Journal of Parasitology**, v.20, n.5, p.603-13, 1990.

MACHADO, R.Z., MONTASSIER, H.J., PINTO, A.A., LEMOS, E.G., MACHADO, M.R., VALADAO, I.F., BARCI, L.G., MALHEIROS, E.B. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.71, n.1, p.17-26, 1997.

MAIZELS, R.M., et al. Evidence of modification and turnover of surface antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.7, p.26, 1983. Supplement.

MAIZELS, R.M., SAVIGNY, D., OGILVIE, B.M. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. **Parasite Immunology**, Oxford, v.6, n.1, p.23-37, 1984.

MAIZELS, R.M., et al. Protease inhibitors. In:____. **Parasite antigens, Parasite genes: A laboratory manual for molecular parasitology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p.103-4.

MASSRY, A.A. Characterization of antigenic property of *Toxocara canis* and *Toxocara leonina* adults and larvae through immunodiagnostic electrophoresis (SDS-PAGE) and "Western blot" technique. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.29, n.2, p.335-45, 1999.

MEGHJI, M., MAIZELS, R.M. Biochemical properties of larval excretory-secretory glycoproteins of the parasitic nematode *Toxocara canis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.18, n.2, p.155-70, 1986.

MIA, S., DEWAN, M.L., UDDIN, M., CHOWDHURY, M.V.A. The route of infection of buffalo calves by *Toxocara (Neoascaris) vitulorum* **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v 7, p.153-6, 1975.

NEVES, M.F. **Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos e eosinófilos.** 2001. 80f. Dissertação (Mestrado – Sistema de Produção Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira.

PAGE, A.P., RICHARDS, D.T., LEWIS, J.W., OMAR, H.M., MAIZELS, R.M. Comparison of isolates and species of *Toxocara* and *Toxascaris* by biosynthetic labelling of somatic and ES proteins from infective larvae. **Parasitology**, London, v.103, p.451-64, 1991.

PARSONS, J.C., BOWMAN, D.D., GRIEVE, R.B. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocaríasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.35, n.5, p.974-981, 1986.

RAJAPAKSE, R.P.V.J., VASANTHATHILAKE, V.W., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. Collection of eggs and hatching and culturing second-stage larvae of *Toxocara vitulorum* in vitro. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.78, n.6, p.1090-2, 1992.

RAJAPAKSE, R.P.V.J., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (*Bubalus bubalis*) to calves and levels of infection with *T. vitulorum* in the calves. **Research in Veterinary Science**, v.57, n.1, p.81-7, 1994.

ROBERTS, J.A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.37, n.2, p.113-20, 1990a.

ROBERTS, J.A. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.20, n.7, p.833-40, 1990b.

ROBERTS J.A.; FERNANDO S.T.; SIVANATHAN S. *Toxocara vitulorum* in the milk of buffalo (*Bubalus bubalis*) cows. **Research in Veterinary Science**, v.49, n.3, p.289-91, 1990.

ROBERTS, J.A. *Toxocara vitulorum* in ruminants. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v.63, p.545-68, 1993.

SAVIGNY, D.H. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES for use serodignostic test for visceral larval migrans. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.61, n.4, p.781-2, 1975.

SAVIGNY, D.H., TIZZARD, J.R. *Toxocara* larva migrans: the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody test. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.6, p.501-7, 1977.

SAVIGNY, D.H., VOLLER, A., WOODRUFF, A.W. Toxocaríasis: serological diagnosis by enzyme immuno-assay. **Journal of Clinical Pathology**, v.32, n.3, p.284-8, 1979.

SCOTT, D.I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v.119, p.153-187, 1989.

SMITH, H.V., QUINN, R., KUSEL, J.R., GIRDWOOD, R.W. The effect of temperature and antimetabolites on antibody binding to the outer surfaces of second stage *Toxocara canis* infective larval. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.4, n.3-4, p.183-93, 1981.

SMITH, H.V. A rapid method for hatching infective eggs of *Toxocara canis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, n.2, p.215, 1989.

SOUZA, E.M. **Respostas imunológicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Toxocara vitulorum***. 2001. 92f. Dissertação (Mestrado – Sistema de Produção Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira.

SRIVASTAVA, S.C. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782) Travassos, 1907 in intestinal perforation with its localization in liver of buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, v.40, p.758-62, 1963.

STARKE, W.A., MACHADO, R.Z., HORNER, M.R., ZOCOLLER, M.C. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no município de Andradina (SP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.35, p.651-64, 1983

STARKE, W.A., MACHADO, R.Z., ZOCOLLER, M.C. Transmissão transmamária de larvas de nematóides gastrintestinais a bezerros búfalos. II. Larvas de *Toxocara vitulorum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.44, p.97-103, 1992.

STARKE, W.A., MACHADO, R.Z., BECHARA, G.H., ZOCOLLER, M.C. Skin hypersensitivity tests in buffaloes parasitized with *Toxocara vitulorum*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.63, n.3-4, p.283-90, 1996.

STARKE-BUZETTI, W.A., MACHADO, R.Z., ZOCOLLER-SENO, M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Toxocara vitulorum* in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, n.1, p.55-64, 2001.

SUGANE, K., OSHIMA, T., Purification and characterization of excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. **Immunology**, Oxford, v.50, n.1, p.113-20, 1983.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.76, n.9, p.4350-4, 1979.

TONGSON, M.S. *Neoascaris vitulorum* larvae in milk of Murrah buffalo. **Phillipine Journal Veterinary Medicine**, v.10, n.1, p.60-4, 1971.

WAKELIN, D. Gastrointestinal nematodes. In:___**Immunity to parasites**: how parasitic infections are controlled. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. p.122-45.

WARREN, E.G. Studies on the morphology and taxonomy of the genera *Toxocara* Stiles, 1905, and *Neoascaris* Travassos, 1927. **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v.185, p.393-442, 1970.

WARREN, E.G. Observation on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.1, p.85-99, 1971.

WHITLOCK, H.V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Journal Count. Science Ind. Research Australian**, v.21, p.177-80, 1948.

ZARNOWSKA, H., JASTRZEBSKA, M. Excretory-secretory larval antigens of *Toxocara canis*: physico-chemical characteristics and specificity assayed by "Western blot". **Acta Parasitologica**, Warsaw, v.39, n.1, p.41-5, 1994.