

Viviane de Oliveira Vasconcelos

**Identificação e purificação de proteínas de
Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1886),
Kamensky, 1905 e avaliação da resposta
humoral em cães com angiostrongilose**

Belo Horizonte, 2007

Viviane de Oliveira Vasconcelos

**Identificação e purificação de proteínas de
Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1886)
Kamensky, 1905 e avaliação da resposta humoral
em cães com angiostrongilose**

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Helminologia.

Orientador: Dr. Walter dos Santos Lima

Belo Horizonte, 2007

Viviane de Oliveira Vasconcelos

**Identificação e purificação de proteínas de
Angiostrongylus vasorum (Baillet, 1886)
Kamensky, 1905 e avaliação da resposta humoral
em cães com angiostrongilose**

Orientador:

Dr. Walter dos Santos Lima

Laboratório de Helminologia Veterinária, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

Co-orientador:

Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vítor

Laboratório de Toxoplasmose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.

Colaborador:

Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Laboratório de Imunologia e Bioprodutos, Departamento de Ciências-Biomédicas, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte - MG.

Belo Horizonte, 2007

Trabalho realizado no Laboratório de Helminologia Veterinária, no Laboratório de Toxoplasmose do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Imunologia e Bioprodutos do Departamento de Ciências-Biomédicas, Fundação Ezequiel Dias, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e do Programa de Pós-graduação em Parasitologia.

A meta sempre se afasta de nós, pois quanto mais progredimos, mais nos tornamos conscientes de nossa fraqueza. Mas é no esforço que encontramos a satisfação, não no êxito. O esforço sem reserva vale vitória total (Mahatma Gandhi).

*Dedico
Ao nosso Criador...*

*Agradeço ao Senhor por que me criastes me fizeste cristão e conservastes
a vida e a saúde, que todas as minhas ações correspondem a vossa
vontade, que a vossa graça e luz permaneçam sempre comigo que com
todos que amo...*

*Com carinho para minha mãe, Maria de Lourdes, ao meu irmão
Márcio e cunhada Val, meu muito obrigado pelo amor sempre
constante.*

Léo,

*“Vou te contar meus olhos já não podem ver
Coisas que só o coração pode entender
Fundamental é mesmo o amor é impossível ser feliz sozinho*

*O resto é mar, é tudo que não sei contar
São coisas lindas que eu tenho pra te dar
Vem de mansinho à brisa e me diz é impossível ser feliz
sozinho...”*

Antônio Carlos Jobim

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos..... Este é o item que todo mundo que está redigindo a sua tese deseja chegar. Sinaliza o final de mais uma etapa. Estive pensando neste item a pelo menos uns 3 meses atrás. São tantas as pessoas que participaram, não somente da elaboração deste trabalho, mas do meu crescimento espiritual. Precisaria começar a agradecer deste o início da minha formação, desde a minha chegada a UFJF até aqui, onde me encontro. Quem diria em!!!! Estou na UFMG.

Então vamos aos agradecimentos: primeiramente não poderia deixar de agradecer a uma pessoa que me incentivou ao máximo para que eu pudesse continuar após o meu mestrado... Dr. John Furlong.... foi mais que um professor, um mestre, um amigo, não tenho palavras para agradecer a esta pessoa que tanto acreditou no meu potencial quando não mais queria dar continuidade a pesquisa achando que eu não iria dar “conta do recado”. Uma pessoa que vale a pena ter passado pela sua vida, quem não o conhece está perdendo uma grande oportunidade. A você John, meu muitíssimo obrigado por tudo, mesmo que as circunstâncias nos tenham levado a tomar outros rumos, outras decisões, eu nunca esquecerei o quanto importante você foi para a minha formação.

Bom, quando cheguei a UFMG me deparei com problemas que eu não sabia como enfrentá-los. Foi tudo tão diferente, e como temos muito medo do “diferente”!!!! Mas aos poucos, fui conhecendo pessoas que fizeram com que as coisas ficassem mais tranquilas. Quando me propuseram este trabalho veio a minha cabeça o nome de um professor que eu acabara de conhecer em uma das matérias que fiz durante o curso e fui ao seu encontro pedir auxílio. Foi quando fiquei conhecendo as pessoas mais incríveis que já passaram na minha vida. Professor Ricardo Wagner do laboratório de Toxoplasmose, uma pessoa especial, iluminada que com toda a paciência do mundo se prontificou a me ajudar em um trabalho sobre um parasito que ele conhecia tão pouco. Rosa, a mãe de todos no laboratório, como já não bastasse a suas três filhas, ela ainda adotou mais uma. Encontrei nela uma grande amiga, uma pessoa pronta a ajudar a qualquer hora e no que for preciso. Meu muito obrigado por tudo Rosa!!!! A Geane,

Carol, Lucas e todos os estagiários do laboratório de Toxoplasmose, sem a ajuda de vocês este trabalhado ficaria muito mais difícil de ser realizado.

A segunda parte do meu trabalho foi realizada na FUNED. O Dr. Luiz Guilherme do laboratório de Imunologia e Bioprodutos é um pesquisador como poucos. Uma pessoa que se prontificou a embarcar neste trabalho, uma pessoa pronta a expandir seus conhecimentos, porque, mesmo trabalhando com toxinas, foi fundamental para a execução deste trabalho. Juntamente com ele, as pessoas que trabalham ou trabalharam em seu laboratório: Paty Cota, Elaine, Zumpano, Isabela, Joice com “i”, Horácio, Paulo, Theonys e Mariana, muito obrigado pela amizade. A secretária da Divisão Biomédica, Regina, minha companheira nas horas do almoço e Ana Valentim, a mestre da cromatografia. A FUNED, na pessoa da Dr. Thaís Viana que permitiu o uso das dependências da fundação para a realização deste trabalho.

Bom, quando o Dr. John me propôs que fizesse o doutorado na UFMG, ele foi logo ligando para um amigo no qual poderia me auxiliar. Marcamos uma entrevista com ele e o nervosismo tomou conta de mim. Os primeiros meses foram muito difíceis, cidade diferente, não conhecia ninguém. E para piorar a situação, eu não estava me sentindo a vontade e por isso não aparecia no laboratório, fui me afastando, daí veio o primeiro “puxão de orelhas”. Precisava de alguém que me colocasse em órbita novamente e uma frase que o professor Walter me disse que eu nunca vou me esquecer: “... para mim a primeira impressão não é a que fica e sim a última”. Foi a minha sorte, porque percebi que não havia deixado uma boa impressão. A partir daí fui me interando dos assuntos do laboratório, fui conhecendo as pessoas que ali trabalhavam e a amizade que construí foi fundamental para que eu pudesse dar início ao meu trabalho. Identifiquei-me tanto com as pessoas do laboratório que acabei mudando o meu projeto inicial de doutorado.

Comecei a fazer parte da “Família do Laboratório” como dizia a nossa amiga Jozi. Assim, queria agradecer a abraçar um a um; Sílvia, minha amiga para todas as horas que juntamente com o Márcio, “menininho que Deus guarda” e o Edu Capítólio, fizeram das tarefas mais difíceis as mais prazerosas. Valeu minha gente!!! Amo vocês. Não poderia deixar de agradecer a Edna, uma super amiga, meiga e sincera. A Eveline, Thiago, Ana Paula e todos os estagiários que passaram pelo laboratório. A Lanuze, meu braço direito no canil, sem a ajuda dela eu não conseguia manter o meu trabalho na

FUNED e cuidar dos cães na Federal. Ao casal vinte, Renata e Sydnei, pelo apoio e pela grande amizade. A Dra. Joziana ao Dr. Thales que sem a ajuda de vocês eu não conseguiria nem ao menos começar os experimentos. Que correria para conseguir os conjugados em!!!! E por fim, mas não menos importante, o “chefe”, professor Walter. Um profissional que me ensinou a ser perseverante e ter coragem de arriscar. Walter, meu muito obrigado por tudo, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em mim.

Aos amigos que fiz durante o curso, Andrey, Ceres, Cíntia, Léo, Raul, Lívio e Kézia, obrigada pelo melhores momentos que passei nos corredores do Departamento, no cafezinho do seu Nerí!!!

Agradeço a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, a professora Norma e ao professor Nélder que contribuíram durante a qualificação e relatoria, aos professores e funcionários do Departamento de Parasitologia e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia na pessoa de seu coordenador Professor Pedro Marcos Linardi. Agradeço também ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Grande parte da força que temos para conseguir alcançar os objetivos vem da família. O porto seguro nas horas que mais precisamos de colo. Quantas vezes ao telefone não conseguimos conter a emoção de estarmos distante e a vontade de sair correndo ao encontro é quase inevitável. Por isso, agradeço por fazer parte desta “grande família” que no começo éramos somente três e que em tão pouco tempo crescemos e agora somos sete. Mãe, Marcinho, Val, Léo, Lucas e o mais novo membro da família Otávio. Sem vocês eu não teria chegado tão longe!!! Milhões de beijos a todos e amo muito vocês.

E por falar em família, estou começando a formar a minha... Léo, por tudo que passamos para conseguir ficarmos juntos. Passamos os melhores momentos da vida acadêmica juntos e no doutorado tivemos que nos separar. Mas nem mesmo a distância fez com que desistimos dos nossos planos. Hoje, você mais do que ninguém, sabe das angústias que passei, do estresse e mau-humor que você teve que suportar. E é por tudo isso que digo que este trabalho é nosso. Tem um pouquinho de você em cada linha, em cada expressão!!!!Te amo!!! E queria muito agradecer pela paciência, pelo carinho, pelo cafuné e pelo colo.

Por fim, agradeço a Deus, por ter me dado força nas horas mais difíceis, alento nas horas de desespero e também por ter me proporcionado vivenciar cada momento destes 4 anos com saúde e paz!!!!

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 – Histórico.....	04
1.2 – Posição Taxonômica.....	04
1.3 – Morfologia de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	05
1.4 - Distribuição.....	05
1.5 - Ciclo Evolutivo.....	06
1.6 – Patologia.....	08
1.7 – Diagnóstico.....	10
2 – JUSTIFICATIVA	14
3 – OBJETIVOS	17
3.1 - Objetivo Geral.....	18
3.2 - Objetivos Específicos.....	18
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 - Manutenção da Cepa de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	20
4.1.1 - Recuperação de larvas de primeiro estágio (L1).....	20
4.1.2 - Infecção dos moluscos.....	20
4.1.3 - Recuperação de larvas de terceiro estágio (L3).....	21
4.2 - Animais.....	21
4.2.1 - Infecção experimental.....	22
4.2.2 – Coleta dos soros.....	23
4.3 - Procedimento de Necrópsia.....	23
4.4 - Identificação das Proteínas de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	24
4.4.1 - Preparações de antígenos de L1 e parasito adulto.....	24
4.4.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
4.4.2.1 - Coloração pelo Azul de Coomassie.....	26
4.4.3 - “Immunoblotting”.....	26

4.5-Purificação dos Anticorpos Policlonais (PcAbs) anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i> por Cromatografia de Imunoafinidade.....	30
4.5.1-Preparação da Sepharose CL-4B ligada a antígenos de parasito adulto de <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> , <i>Dipylidium caninum</i>	30
4.5.2-Purificação dos anticorpos policlonais anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i>	31
4.5.3-Preparação da Sepharose CL-4B ligada a antígenos de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	31
4.5.4-Avaliação da especificidade dos anticorpos policlonais anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i>	31
4.6-Purificação de Proteínas Específicas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> por Cromatografia de Imunoafinidade.....	33
4.6.1-Preparação da coluna imunoafinidade contendo de Proteína A ligada aos PcAbs purificados anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i>	33
4.6.2-Purificação das proteínas de antígeno bruto solúvel de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	34
4.6.2.1-Coloração do gel de poliacrilamida por Nitrato de Prata.....	35
4.7-Avaliação da Especificidade das Proteínas Purificadas de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	35
4.7.1 -Cálculo do limite de detecção	36
4.8-Análise Estatística.....	36
4.8.1-Cálculo da Sensibilidade e Especificidade.....	37
5 – RESULTADOS	38
5.1-Separação das Proteínas de L1 de <i>Angiostrongylus vasorum</i> por Eletroforese.....	39
5.2-Separação das Proteínas de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> por Eletroforese.....	40
5.3-“Immunoblotting”.....	41
5.3.1-Identificação de proteínas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG.....	41
5.3.2-Identificação de proteínas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM.....	49
5.3.3-Identificação de proteínas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA.....	57
5.3.4-Identificação de proteínas de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE.....	65
5.4-Purificações dos Anticorpos Policlonais Anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i>	74
5.5-Avaliação da Especificidade dos Anticorpos Policlonais Anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i> Purificados pela Cromatografia de Imunoafinidade....	75

5.6-Purificações de Proteínas Específicas de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	78
5.7-Avaliação da Cinética de Produção de Anticorpos Policlonais IgG Anti-Proteína Purificada de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	75
5.8-Avaliação da Especificidade da Proteína de 51 kDa Purificada de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	80
6 – DISCUSSÃO	84
6.1-Identificação de Proteínas de Larvas de Primeiro Estádio (L1) e de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> Reconhecidas por Anticorpos de Diferentes Isotipos.....	84
6.2-Purificação da Proteína Purificada de 51 kDa de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	88
6.3-Avaliação da Cinética de Produção de Anticorpos Policlonais IgG anti-Proteína Purificada de Parasito Adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	90
7 – CONCLUSÕES	94
8 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9 – ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Análise eletroforética do antígeno bruto solúvel de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> analisado em gel de poliacrilamida com redução na concentração de 10% corado pelo Azul de Coomassie.....	39
Figura 2-Análise eletroforética do antígeno bruto solúvel de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> analisado em gel de poliacrilamida com redução na concentração de 7,5% corado pelo Azul de Coomassie.....	40
Figura 3-Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	43
Figura 4-Identificação das proteínas de parasitos adultos de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	46
Figura 5-Identificação das proteínas de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães naturalmente infectados por <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i>	48
Figura 6-Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após infecção.....	51
Figura 7-Identificação das proteínas de parasitos adultos de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	54
Figura 8-Identificação das proteínas de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães naturalmente infectados por <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i>	56
Figura 9-Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	59

Figura 10-Identificação das proteínas de parasitos adultos de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	62
Figura 11-Identificação das proteínas de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães naturalmente infectados por <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i>	64
Figura 12-Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	67
Figura 13-Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães naturalmente infectados por <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i>	69
Figura 14-Identificação das proteínas de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção.....	71
Figura 15-Identificação das proteínas de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães naturalmente infectados por <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i>	73
Figura 16–SDS-PAGE a 10% com redução, do antígeno de parasito adulto, do antígeno de larva de primeiro estágio na concentração de 10µg, revelando a proteína purificada de 51 kDa corada por Nitrato de Prata.	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-Protocolo para identificação de proteínas imunoreativas de antígeno bruto de larva de primeiro estágio (L1) e parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i> utilizando soros de cães experimentalmente infectados.....	28
Quadro 2 –Painel de anticorpos utilizados nos testes imunológicos para detectar classes de imunoglobulinas presentes nos soros de cães infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgG presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).....	42
Tabela 2-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgG presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.....	45
Tabela 3-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgM presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).....	50
Tabela 4-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgM presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.....	53
Tabela 5-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgA presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).....	58
Tabela 6-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgA presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.....	61
Tabela 7-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgE presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).....	66
Tabela 8-Freqüência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgE presentes em soros de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-Anticorpos policlonais anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i> purificados a partir de soro de cães experimentalmente infectados por <i>Angiostrongylus vasorum</i> por cromatografia de afinidade usando Sepharose 4B-CNBr ligada a antígeno bruto solúvel de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	74
Gráfico 2-Especificidade dos anticorpos policlonais anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i> purificados por cromatografia de afinidade usando Sepharose 4B CNBr ligada aos antígenos de <i>Toxocara canis</i> , <i>Ancylostoma caninum</i> e <i>Dipylidium caninum</i> por ELISA indireto.....	76
Gráfico 3-Especificidade dos anticorpos policlonais anti- <i>Angiostrongylus vasorum</i> purificados por cromatografia de afinidade Sepharose 4B CNBr ligada ao antígeno de <i>Angiostrongylus vasorum</i> por ELISA indireto.....	77
Gráfico 4-Cinética de produção de anticorpos IgG que reagem com antígeno bruto e proteína purificada de 51 kDa de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	80
Gráfico5-Distribuição dos valores em absorbância para detecção de anticorpos policlonais IgG anti-antígeno bruto e anti-proteína de 51 kDa purificada de parasito adulto de <i>Angiostrongylus vasorum</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
AcMo	Anticorpo monoclonal
AgL1Av	Antígeno de larva de primeiro estágio de <i>A. vasorum</i>
AgPAAv	Antígeno de Parasito adulto de <i>A. vasorum</i>
AgPAAc	Antígeno de Parasito adulto de <i>A. caninum</i>
AgPADc	Antígeno de Parasito adulto de <i>D. caninum</i>
AgPATc	Antígeno de Parasito adulto de <i>T. canis</i>
BSA	Soro albumina bovina
CCZ-BH	Centro de Controle de Zoonoses de Belo Horizonte
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNBr	Brometo de Cianogênio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DPI	Dias pós infecção
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
<i>g</i>	Gravidade
HD	Hospedeiro definitivo
HI	Hospedeiro intermediário
HPRO	Peroxidase
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
kDa	Kilodaltons
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
M	Molar
N	Controle negativo
mL	Mililitro
mA	Miliamper
mM	Milimolar

μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
nm	Nanômetro
OPD	o-fenilenodiamina
P	Controle positivo
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PcAbs	Anticorpos Policlonais
PM	Padrão de Peso Molecular
SRD	Sem raça definida
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
ST	Solução tampão
TA	Temperatura ambiente
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Voltagem
Vam	Valor médio da absorbância
W	Watts

RESUMO

Angiostrongylus vasorum é um nematóide parasito cujas formas adultas podem ser encontradas no sistema circulatório de cães domésticos e canídeos silvestres. Cães infectados por *A. vasorum* podem apresentar diversas manifestações clínicas podendo levar o animal ao óbito. Os testes padronizados para o diagnóstico sorológico utilizando antígeno bruto de parasito adulto de *A. vasorum* não são considerados ideais. A identificação e purificação de proteínas espécie-específicas é de grande importância para obter maiores índices de sensibilidade e especificidade nos testes de diagnóstico. Neste estudo foram utilizadas amostras de soro de 20 cães infectados experimentalmente com larvas de terceiro estágio (L3) e amostras de soro de 60 cães infectados naturalmente por outros helmintos gastrointestinais para a separação e identificação das proteínas espécie-específicas. Immunoblotting revelou reatividade para IgG, IgM, IgA e IgE contra proteínas de *A. vasorum* com peso molecular de 18 a 209 kDa. As proteínas de 51, 63, 92 e 209 kDa não foram reconhecidas por anticorpos IgG presentes no soro de cães naturalmente infectados por outros helmintos. Anticorpos específicos anti- *A. vasorum* foram adsorvidos por imunoafinidade e acoplados em resina Sepharose Proteína A para a purificação de proteínas específicas. A proteína de 51 kDa foi obtida. O teste de ELISA demonstrou alta reatividade espécie-específica com soro de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* obtendo um índice de 100 % de sensibilidade e especificidade.

ABSTRACT

Angiostrongylus vasorum is a parasitic nematode that infects the circulatory system of domestic dogs and wild canids. *A. vasorum* infection of dogs displays diverse clinical signs and induces the death of the animal. Standardized tests for serological diagnosis using crude antigens of adults of *A. vasorum* are not regarded as ideal. The identification and purification of species-specific proteins would improve diagnosis. In this study, serum samples from 20 experimentally infected dogs with third stage larvae (L3) and serum samples from 60 naturally infected dogs were used to screen for and identify specific proteins. Immunoblotting studies revealed reactivity for IgG, IgM, IgA and IgE against parasitic proteins ranging from 18 to 209 kDa. Proteins of 51, 63, 92 and 209 kDa were not reactive with serum from dogs infected with different parasites. Immunoaffinity adsorbed anti-*A. vasorum* specific antibodies were coupled to protein A Sepharose for the purification of *A. vasorum* specific proteins. The 51 kDa protein was obtained. ELISA showed the 51 kDa protein with high species-specificity reacting with the serum from dogs experimentally infected with *A. vasorum* but not with serum from dogs naturally infected with different parasites. ELISA sensitivity and specificity was 100%.

1-INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

As 13 espécies conhecidas de parasitos pertencentes ao gênero *Angiostrongylus* (Nematoda: Angiostrongylidae) localizam-se nas artérias pulmonares e no sistema circulatório de mamíferos insetívoros, roedores, canídeos e felídeos (ANDERSON, 1992; COSTA *et al.*, 2003). Dentre essas, três são de importância médica - veterinária: *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus costaricensis* e *Angiostrongylus vasorum* (ECKERT & LÄMMLER, 1972).

A. cantonensis, agente etiológico da meningite eosinofílica humana, é parasito de artérias pulmonares de roedores e possui moluscos como hospedeiros intermediários. O homem se infecta ao ingerir acidentalmente moluscos infectados ou alimentos contaminados com larvas de terceiro estágio, os quais migram para o sistema nervoso central ocasionando distúrbios neurológicos. Este parasito é endêmico no Sudoeste da Ásia, Índia, Austrália e América do Norte (ALICATA, 1988; PIEN & PIEN, 1993).

A. costaricensis, localiza-se nas artérias mesentéricas de roedores, é o agente etiológico da angiostrongilose abdominal das américas. A infecção humana ocorre acidentalmente via ingestão de alimentos e água contaminados com larvas de terceiro estágio presentes na secreção ou por contato direto com o muco de moluscos infectados (WAISBERG, *et al.*, 1999). A angiostrongilose abdominal tem sido registrada deste o sul dos Estados Unidos, norte da Argentina e Sul do Brasil (MOREIRA, 1988 *apud* GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 1991).

A. vasorum, é um nematóide cujas formas adultas podem ser encontradas parasitando artérias pulmonares e suas ramificações de cães domésticos e canídeos silvestres. Apresenta uma ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes. A patologia e as manifestações clínicas são múltiplas estando relacionadas com o desenvolvimento e localização do parasito nos órgãos infectados (DODD, 1973; PRESTWOOD *et al.*, 1981; RAMSEY *et al.*, 1996; BRENNAN *et al.*, 2004).

Apesar de ainda não terem sido relatados casos em humanos infectados por *A. vasorum*, a possibilidade não pode ser descartada. Segundo, McCARTHY & MOORE (2000), existem inúmeros fatores que favorecem a emergência de novos parasitos com potencial zoonótico, incluindo mudanças nos hábitos culturais, sociais e alimentares, além de alterações ambientais, levando a um aumento na exposição ao parasito, e

consequentemente a um reconhecimento significativo de infecções helmínticas com potencial zoonótico.

O diagnóstico da angiostrongilose canina é confirmado através do encontro de L1 nas fezes de cães infectados, pelo método de Baermann. A identificação torna-se mais precisa quando os parasitos são avaliados pelo exame morfológico. Porém, este método é raramente possível, uma vez que a liberação larval é irregular.

Diante das dificuldades dos exames parasitológicos, tem-se a necessidade de se recorrer aos exames sorológicos para o diagnóstico da angiostrongilose canina. Vários ensaios imunológicos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, porém com algumas limitações, como por exemplo, a presença de antígenos comuns a outros parasitos, caracterizando reatividade cruzada. Portanto, os esforços vêm sendo dirigidos na busca de um antígeno que permita identificar especificamente os anticorpos produzidos contra *A. vasorum*.

1.1 – Histórico

A. vasorum é um parasito do sistema circulatório de cães domésticos e canídeos silvestres que foi encontrado pela primeira vez por SERRES (1853) na França, após a observação de nematóides no sistema circulatório de um cão que morreu subitamente na cidade de Toulouse.

Em 1866, BAILLET descreveu este parasito como sendo *Strongylus vasorum* e posteriormente BOSSI, em 1871 o classificou como *Ematozoa filaria cardiaca*.

Em 1905, KAMENSKY, discutindo a posição sistemática destas duas espécies de protostrongilídeos e pelas suas características morfológicas concluiu que as espécies descritas anteriormente, pertenceriam ao gênero distinto: *Angiostrongylus*, incluindo as espécies *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) e *Angiostrongylus cardiacus* (Bossi, 1871).

Mais tarde, RAILLET & HENRY (1907) criaram o gênero *Haemostongylus* para a espécie *Strongylus vasorum*. Este gênero foi reconhecido por diversos autores, porém estabelecendo a prioridade do nome *Angiostrongylus*, conforme as regras Internacionais de Nomenclatura Zoológica, fazendo o gênero *Haemostongylus* cair em sinonímia.

COSTA (1992) comparando as descrições feitas do parasito por vários autores, concluiu como sinônimos de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905, as seguintes espécies: *Strongylus vasorum* Baillet, 1866; *Entomozoa filaria cardiaca* Bossi, 1971; *Haemonchus vasorum* (Baillet, 1866) Slviter & Swellwngrebel, 1912; *Haemostongylus railliet* Travassos, 1927; *Angiostrongylus railliet* (Travassos, 1927) Dougherty, 1946; *Angiocaulus railliet* (Travassos, 1927) Grisi, 1971.

1.2 - Posição Taxonômica

Na classificação taxonômica atual, a espécie *Angiostrongylus vasorum* segundo COSTA *et al.*, (2003) pertence à Classe Nematoda, Ordem Strongylidae, Superfamília Metastrongyloidea, Família Protostrongylidae, Subfamília Angiostrongylinae, Gênero *Angiostrongylus*, Espécie *Angiostrongylus vasorum*.

1.3 - Morfologia de *Angiostrongylus vasorum*

A espécie é caracterizada por apresentar corpo delgado e alongado, ligeiramente atenuado nas extremidades, coloração esbranquiçada ou rósea quando recém-colhidos. A cutícula é fina e transparente, deixando perceber o aspecto helicoidal dos órgãos genitais em torno do tubo digestivo, contrastando sua coloração esbranquiçada com a tonalidade rósea ou acinzentada do intestino. Apresenta uma ligeira dilatação na cutícula da extremidade cefálica, abertura bucal pequena e ovalada e apresentando seis papilas peri-bucais. O poro excretor situa-se ventralmente abaixo da união do esôfago e intestino. Os machos medem cerca de 13 mm de comprimento por 0,24 mm de largura, apresentando a extremidade posterior levemente recurvada ventralmente. Apresentando bolsa copuladora e raios bursais evidentes. As fêmeas, entretanto, são maiores e mais robustas, medem cerca de 17 mm de comprimento por 0,26 mm de largura (LIMA *et al.*, 1985; COSTA, 1992; COSTA *et al.*, 2003). As larvas de primeiro e terceiro estágio de *A. vasorum* têm em comum a presença de um botão cefálico na extremidade anterior e cauda levemente recurvada (CONBOY, 2000).

1.4 - Distribuição

A distribuição de *A. vasorum* parasitando cães domésticos é caracterizada por áreas endêmicas e regiões de ocorrência isolada do parasito (BOLT *et al.*, 1994). Dentre as principais áreas endêmicas está o oeste da Alemanha (PALLASKE, 1967), Irlanda (DODD, 1973; JACOBS & PROLE, 1975; LYNCH, 1977, WILLIAMS *et al.*, 1985) Inglaterra (SIMPSOM & NEAL, 1982; COBB & FISHER, 1990; SIMPSOM, 1996; KRIEK, 2001; CHAPMAN *et al.*, 2004) e a Dinamarca (BOLT *et al.*, 1993). Com relação aos casos isolados, existem relatos de *A. vasorum* em países como Suíça (ECKERT & LÄMMLER, 1972), Uganda (BWANGAMOI, 1974), Ásia (ECKERT & LÄMMLER, 1972), Austrália (ROBERTS, 1940), Itália (POLI *et al.*, 1984), Dinamarca (WILLINGHAM *et al.*, 1996), Estados Unidos, Canadá (CONBOY *et al.*, 1997), Espanha (SEGOVIA *et al.*, 2001) e Hungria (SRÉTER *et al.*, 2003).

O estudo sobre a prevalência de *A. vasorum* parasitando cães domésticos e

canídeos silvestres são escassos. DODD (1973) encontrou 80% de infecção natural em cães na Irlanda, BWANGAMOI (1974) verificou em Uganda, na África, a ocorrência de 21% de cães naturalmente infectados. Na Itália, foi observada uma prevalência de 26,6% de raposas parasitadas por *A. vasorum* (POLI 1984). Em Copenhagem, WILLINGHAN (1996) encontrou uma prevalência de 35,6% de *A. vasorum* em raposas e mais recentemente, SEGOVIA *et al.* (2001) determinaram uma prevalência de 21% de infecção em lobos na Espanha, demonstrando desta forma, a importância destes animais na manutenção do ciclo deste parasito.

No Brasil, TRAVASSOS (1927) relatou um caso de canídeo silvestre infectado, por *Haemostromylus railliet* (= *A. vasorum*) recuperados do ventrículo direito e artéria pulmonar de cachorro do mato (*Cerdocyon thous azarae*), provenientes do município do Rio de Janeiro. A ocorrência de *A. vasorum* em cães domésticos (*Canis familiaris*) provenientes do Rio Grande do Sul foi relatada por GONÇALVES (1961). Em 1962, LANGENEGGER *et al.*, registraram o encontro de dois cães naturalmente infectados na cidade do Rio de Janeiro. Em Salvador-BA, FEHRINGER & FIEDLER (1977) cita a ocorrência de dois casos de *A. vasorum* em cães domésticos (*Canis familiaris*). No interior do Estado do Paraná, GIOVANONNI *et al.*, (1985), relataram a ocorrência de *A. vasorum* em um cão adulto, atendido e necropsiado pelo Serviço de Clínica Médica do Hospital da Escola de Agronomia e Veterinária da Universidade Federal do Paraná. Em Minas Gerais, LIMA *et al.* (1985) realizaram a descrição morfológica de espécimes de *A. vasorum*, colhidos das artérias pulmonares de dois cães (*Canis familiaris*) procedentes do município de Caratinga – MG. Estudando a ocorrência de helmintos em cães do mato na Zona da Mata Mineira, HORTA-DUARTE *et al.*, 2004, encontraram *A. vasorum* parasitando uma fêmea de canídeo silvestre (*C. thous azarae*).

1.5 – Ciclo Evolutivo

O ciclo biológico de *A. vasorum*, é do tipo heteroxeno, onde ocorre a participação de canídeos como hospedeiros definitivos e moluscos como hospedeiros intermediários. O mecanismo pelo quais os hospedeiros definitivos adquirem a infecção por *A. vasorum*, permanecia desconhecido até que, em 1960, GUILHON, adicionando à

ração de cães, lesmas do gênero *Arion* provenientes de área enzoótica demonstrou pela primeira vez a participação de moluscos no ciclo evolutivo de *A. vasorum* possibilitando assim, um melhor entendimento do ciclo.

Posteriormente a este trabalho pioneiro, várias espécies de lesmas (*Arion ater*, *Arion rufus*, *Arion lusitanicus*, *Deroceras reticulatum*, *Limax flavus*, *laevicaulus altes*) gastrópodos terrestres (*Achatina fulica*, *Arianta arbustorum*, *Bradybaena similaris*, *Cepaea nemoralis*, *Cochlodina laminata*, *Eceparymphia physana*, *Helix pomatia*, *Helix aspersa*, *Prosopis javanicum*, *Subulina octona*, *Succinea putris*) e gastrópodos aquáticos (*Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria pfeifferi*, *Physa* sp.) foram descritas como possíveis hospedeiros intermediários de *A. vasorum* (ROSEN *et al.*, 1970; GUILHON & CENS, 1973; SAUERLANDER & ECKERT, 1974).

Assim, após a ingestão ou penetração das larvas de primeiro estágio (L1) do parasito, que são eliminadas junto com as fezes do cão, o molusco passa a fazer parte do ciclo, ocorrendo mudas de larvas de primeiro estágio (L1) para larva de segundo estágio (L2) e para larva de terceiro estágio (L3). Embora o molusco não faça parte da alimentação eleita pelos cães, à ingestão pode ocorrer de forma acidental junto com a água, grama ou ainda pelo hábito coprofágico realizados por alguns cães que acabam ingerindo moluscos infectados que colonizam fezes de cães (BESSA, 1996). Além de moluscos como hospedeiros intermediários, BOLT, *et al* (1993), demonstraram que rãs (*Rana temporaria*) infectadas experimentalmente por *A. vasorum*, podem ser inseridas ao ciclo biológico deste parasito, atuando como hospedeiros paratênicos.

As larvas infectantes (L3), após serem ingeridas pelos cães, penetram na parede do trato digestivo migram até os linfonodos mesentéricos, onde ocorre a muda de L3 para larva de quarto estágio (L4) e para larva de quinto estágio (L5). As L5, ou adultos imaturos, alcançam a corrente sangüínea e, aproximadamente, no décimo dia são encontrados no ventrículo direito e nas artérias pulmonares. Os helmintos alcançam à maturidade sexual por volta do trigésimo dia de infecção, nas artérias pulmonares onde ocorre a cópula. As fêmeas migram para as pequenas ramificações da artéria pulmonar e iniciam a postura dos ovos não embrionados. Nas pequenas ramificações das artérias pulmonares, ocorre o embrionamento dos ovos até o desenvolvimento de L1 que eclodem e atravessam ativamente para os alvéolos, bronquíolos e brônquios, migrando para a traquéia as quais alcançam o meio exterior juntamente com as secreções

pulmonares ou são deglutidas, sendo eliminadas junto com as fezes (GUILHON & CENS, 1973; BWANGAMOI, 1974; MAHAFFEY *et al.*, 1981; PATTESON *et al.*, 1993).

No ambiente, as L1 podem permanecer no bolo fecal ou atingir coleções de água na qual o molusco pode se infestar dando continuidade ao ciclo.

Segundo CURY & LIMA (1996) o período pré-patente de *A. vasorum* em cães experimentalmente infectados pode variar de 28 a 108 dias. Em infecções crônicas e subclínicas os parasitos adultos podem viver e continuar a colocar ovos durante toda a vida do hospedeiro (CONBOY, 2000).

LIMA *et al.* (1994) ao encontrarem larvas de primeiro estágio de *A. vasorum* nas fezes de raposas (*Dusicyon vetulus*) ressaltaram a importância de canídeos silvestres como reservatório na manutenção da infecção em cães domésticos. Além de canídeos, o *A. vasorum* também foi observado parasitando texugos (*Meles meles*) (TORRES *et al.*, 2001) e mustelídeo como a irara (*Tayra barbara senex*) (YAMAGUTI, 1961). Adicionalmente, as infecções experimentais comprovaram a permissividade do chacal dourado (*Canis aureus*), gato doméstico (*Felis catus domesticus*) e do rato do Nilo (*Arvicanthis niloticus*) (ECKERT & LÄMMLER, 1972).

1.6 - Patologia

As primeiras descrições anátomo-patológicas em cães parasitados por *A. vasorum* foram realizadas por LAULANIÉ (1882, 1884) *apud* ECKERT & LAMMLER (1972) no qual observou alterações ao nível cárdio-pulmonar, estando relacionada com desenvolvimento do parasito e a localização nos órgãos do cão infectado, como trato intestinal, linfonodos mesentéricos, fígado, pulmão, coração e outros órgãos os quais são invadidos acidentalmente pelo parasito.

Assim, a presença dos parasitos e ovos no interior das arteríolas e capilares pulmonares podem promover a formação de trombos, ocasionando uma insuficiência respiratória em cães infectados (CUILLÉ & DARRASPEN, 1930; PALLASKE, 1967; ECKERT & LAMMLER 1972). Com o avanço da doença, podem-se observar uma aderência entre os pulmões, pericárdio e mediastino (PRESTWOOD *et al.*, 1981).

Com relação às lesões cardíacas, frequentemente observa-se uma dilatação do ventrículo direito e hipertrofia do ventrículo esquerdo devido à resistência a circulação pulmonar pela presença do parasito nos pulmões. Também foram relatadas miocardite crônica e áreas enfartadas que podem variar de acordo com a fase da doença (DARRASPEN *et al.*, 1953; ACEDO *et al.*, 1979).

Os linfonodos mediastinos, bronquiais e submandibulares podem-se apresentar intumescidos e hemorrágicos, caracterizando uma linfadenite generalizada (PRESTWOOD *et al.*, 1981).

Lesões renais decorrentes da infecção também foram observadas. Estas incluem infarto glomerular levando a uma necrose e glomerulonefrite crônica, devido à presença de imunoglobulinas, complemento e fibrinogênio, além de antígenos de parasitos adultos nos glomérulos e tubos coletores (BWANGAMOI, 1974; CARUSO & PRESTWOOD, 1988).

Anormalidades de coagulação sanguínea também é um quadro que pode ocorrer na angiostrongilose canina, onde se observa sufusões hemorrágicas e hematomas cerebrais, as quais desenvolvem trombocitopenia e aumento do tempo de protrombina parcial ativada. As anormalidades de coagulação foram atribuídas à presença do parasito no interior das artérias causando um depósito de imuno-complexos levando inapropriadamente, a ativação da cascata de coagulação fazendo presente a coagulopatia de consumo (SCHELLING *et al.*, 1986; RAMSEY *et al.*, 1996).

Dentre as manifestações clínicas decorrentes da angiostrongilose canina, pode-se observar perda de peso, intolerância a exercícios, dispnéia, alterações nos batimentos cardíacos e presença de edemas localizados em diferentes áreas como no espaço submandibular, tórax e pernas, (DODD, 1973; SIMPSON & NEAL, 1982; PATTESON *et al.* 1987; MIGAUD *et al.*, 1992; BOLT *et al.*, 1994 e CURY & LIMA 1996). Também se pode observar tosse seca persistente, mucosas pálidas e dores abdominais (JONES *et al.*, 1980; BRENNAN *et al.*, 2004).

Distúrbios no sistema nervoso como ataxia, depressão e paralisia dos membros, assim como lesão ocular e conseqüente perda da visão associada à infecção por *A. vasorum* foram descritas por PERRY *et al.*, (1991). Adicionalmente, um caso não usual foi observado por KING *et al.*, (1994) quando constataram em um cão naturalmente infectado presença de larvas na câmara anterior do olho direito.

Resultados de diversos autores mostraram que não existe um comportamento ortodoxo de migração das larvas deste parasito. Assim, as localizações erráticas constituem um fato importante na patogenia da infecção pelo *A. vasorum*, pois, as larvas podem morrer e produzir lesões extensas e graves a ponto de subverter a arquitetura do órgão no qual estão localizadas (ROSEN *et al.*, 1970; BHAIBULAYA, 1975; PERRY *et al.*, 1991; COSTA, 1992; CURY & LIMA, 1995; COSTA & TAFURI, 1997; OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2004).

Apesar de a doença estar, geralmente, associada a esses sinais bastante variados, foram observados casos de animais assintomáticos, o que sugere que a distribuição desta parasitose possa ser bem maior que o relatado na literatura (RAMSEY *et al.* 1996). Contudo, as profundas alterações produzidas no hospedeiro definitivo em decorrência do parasitismo por *A. vasorum*, não são patognomônicas e podem ser confundidas com outras patologias (MAHAFFEY *et al.*, 1981).

1.7 - Diagnóstico

Para o diagnóstico da angiostrongilose canina, o encontro de larvas de primeiro estágio nas fezes do cão é primordial para um diagnóstico específico (CONBOY, 2000). O método de Baermann é o método clássico usado para a demonstração de larvas do parasito nas fezes de cães infectados. O diagnóstico *post mortem* pode ser realizado, onde parasitos adultos, ovos e larvas podem ser encontrados em órgãos parasitados, principalmente no coração e pulmões (COSTA, 1992).

O diagnóstico conclusivo pode ser feito com base nos resultados dos testes laboratoriais conjuntamente com os dados clínicos e epidemiológicos. Entretanto, um diagnóstico definitivo da doença requer a demonstração do parasito. A maior dificuldade, no diagnóstico, porém, deve-se ao fato de os sinais clínicos da doença não serem muito específicos, uma vez que podem ser confundidos com os de outras enfermidades.

Nos animais com suspeita clínica os exames ecocardiográficos, eletrocardiográficos e radiológicos podem ser utilizados como metodologias de auxílio para o diagnóstico diferencial e como forma de acompanhamento das alterações

promovidas pelo parasitismo (CURY, 1999; CURY *et al.*, 2001). DARRASPEN *et al.*, (1953), utilizaram o eletrocardiograma em cães infectados naturalmente e observaram presença de hipertrofia e/ou dilatação do ventrículo direito. Estudos radiológicos em cães naturalmente e experimentalmente infectados demonstraram as primeiras alterações entre cinco a sete semanas após a infecção (PATTESON *et al.*, 1993; RAMSEY *et al.*, 1996; CONBOY, 2000).

Em cães, a lavagem broncoalveolar é utilizada na colheita de amostras para a realização de exames complementares importantes para o diagnóstico de diversas infecções pulmonares (MELLO & FERREIRA, 2003), como por exemplo, na angiostrongilose canina. Embora seja uma metodologia relativamente invasiva, sua utilização permite o encontro de L1 vivas e ativas, recuperadas diretamente dos pulmões, além de permitir um diagnóstico mais rápido detectando larvas antes da passagem pelo trato gastrointestinal (BARÇANTE, 2004).

GUILHON *et al.*, (1970) estudando a reação de hipersensibilidade cutânea em cães infectados experimentalmente por *A. vasorum* e *A. cantonensis* utilizando antígenos de parasitos adultos de *A. cantonensis*, observaram que 11 cães entre 16 inoculados com *A. vasorum* mostraram intradermoreação positiva para o antígeno em questão.

Relatos sobre a utilização dos testes sorológicos demonstram que os mesmos podem se utilizados conjuntamente com os exames parasitológicos no diagnóstico da angiostrongilose canina.

GUILHON *et al* (1971), realizaram os primeiros ensaios de diagnóstico imunológico utilizando antígenos preparados a partir de adultos de *A. vasorum*. Testaram soros de cães inoculados por *A. vasorum* e por *A. cantonensis* e encontraram uma alta especificidade com o antígeno preparado usando os testes de reações de aglutinação de látex, imunoeletroforese e reação de fixação de complemento. Observaram também, que a resposta humoral em cães infectados é caracterizada por um aumento expressivo nos níveis de anticorpos anti- *A. vasorum*.

MISHRA & BENEX (1972) estudaram a especificidade imunológica de *A. vasorum* e *A. cantonensis* e fizeram observações com soros homólogos e reação cruzada entre extratos antigênicos dessas duas espécies de parasitos com soros de ratos e cães infectados respectivamente por *A. cantonensis* e *A. vasorum*. Reações cruzadas

detectadas pelo teste de dupla difusão e eletroforese mostraram linhas comuns de precipitação, demonstrando a presença de antígenos comuns, além de antígenos específicos nos extratos antigênicos desses dois nematóides.

O teste “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) foi utilizado pela primeira vez por COSTA *et al.*, (1996) como um método de diagnóstico da angiostrongilose canina detectando anticorpos reativos para *A. vasorum*. Segundo os autores, há presença de altos níveis de anticorpos IgG circulantes em cães experimentalmente infectados a partir do 14º dia após a infecção decorrente da síntese de antígenos durante a migração e mudas das larvas e a grande atividade metabólica dos parasitos.

Segundo CURY *et al.*, (1996), o teste de ELISA foi capaz de detectar anticorpos específicos anti - *A. vasorum* a partir do 14º dia após a infecção, corroborando com os resultados obtidos por BARÇANTE (2004). Porém, este teste também foi capaz de detectar anticorpos não específicos, caracterizando a ocorrência de reação cruzada com antígenos de outros helmintos. A necessidade de uma pré-adsorção dos soros de cães infectados por *A. vasorum* com antígenos de outros parasitos podem minimizar a interferência de anticorpos não específicos encontrado frequentemente em cães (CURY *et al.*, 1996). Desta forma, para se definir o teste como método sorológico eficiente e específico para o diagnóstico da angiostrongilose canina, há necessidade de se verificar a ausência de reações cruzadas com outras helmintoses.

Com relação à técnica de Immunoblotting, CURY *et al.*, (2002), analisaram o comportamento do anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* utilizando antígeno somático de parasitos adultos. Foi observado um forte reconhecimento das proteínas de peso molecular estimados em 115 e 102 KDa, indicando-as como as principais proteínas na infecção por *A. vasorum*.

Os testes sorológicos possuem algumas limitações como à obtenção de quantidade suficiente de antígenos para análise e o fenômeno de reatividade cruzada, devido à grande complexidade antigênica que os helmintos possuem em relação a bactérias e protozoários (ROSSI *et al.*, 1993). Diante disto, a identificação e caracterização de antígenos purificados ou parcialmente purificados através de técnicas de cromatografia são importantes para o desenvolvimento de testes de diagnósticos.

Diversos grupos de pesquisas vêm demonstrando que a utilização de antígenos purificados em lugar de antígenos totais, contribui para o aumento significativo na especificidade das técnicas de diagnóstico imunológico de helmintos (KAMIYA *et al.*, 1973; SUZUKI *et al.*, 1975; KUM & KO, 1985, 1986; YEN & CHEN, 1991; EAMSOBHANA *et al.*, 2001; ABRAHAM *et al.* 2004).

A identificação e caracterização dos componentes antigênicos são de fundamental importância quando se prepara um antígeno adequado para técnicas de sorodiagnóstico, preparação de vacinas e análises imunopatológicas (REVILLA-NUÍN *et al.*, 2005). Como exemplo, antígenos purificados de *Fasciola hepatica*, *Dirofilaria immitis* e *Schistosoma mansoni* dentre outros, já são utilizados em técnicas de diagnóstico que mostram uma alta sensibilidade e especificidade (GOMEZ-MUNOZ, *et al.*, 1996; FREDES *et al.*, 1997; YANG & CHUNC, 2004).

2-JUSTIFICATIVA

2- JUSTIFICATIVA

Cães infectados por *A. vasorum* podem apresentar manifestações clínicas múltiplas que vão desde uma anemia, alopecia e tosse crônica podendo chegar a uma broncopneumonia hemorrágica e até mesmo levar o animal a morte por insuficiência cardio-respiratória.

Associado a isso, a ocorrência de cães assintomáticos sugere que as condições relacionadas à epidemiologia podem ser mais difundidas do que realmente se tem relatado (MARTIM *et al.*, 1993).

Assim, uma vez que o diagnóstico clínico é pouco conclusivo, novas técnicas têm sido estudadas no intuito de se obter maiores subsídios para um acompanhamento e diagnóstico da infecção.

O método de diagnóstico mais freqüentemente utilizado envolve o encontro e identificação de larvas de primeiro estágio nas fezes de cães (BOLT *et al.*, 1994). Entretanto, em alguns casos, as larvas não são excretadas continuamente, intercalando períodos de alta eliminação com períodos de negatização do exame parasitológico nas fezes, levando a resultados falso-negativos. (PATTESON *et al.*, 1993; BOLT, 1994).

Até o presente, os testes padronizados para o diagnóstico da angiostrongilose canina não levam a resultados satisfatórios, visto que uma vez que detectam anticorpos específicos contra *A. vasorum*, também podem detectar anticorpos inespecíficos, o que resultaria em reações cruzadas contra outros helmintos como *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* podendo levar a uma resposta imunológica com uma especificidade variada.

O “padrão ouro” para a obtenção de resultados positivos para casos de angiostrongilose canina ainda é o exame parasitológico, sendo necessário à padronização de outras técnicas citadas na literatura para o diagnóstico definitivo.

Até o momento, os trabalhos relacionados ao diagnóstico imunológico dessa importante parasitose são realizados utilizando antígenos exclusivos de parasito adulto e para padronização de um teste de diagnóstico conclusivo é necessária a utilização de antígenos purificados para promover resultados eficientes na detecção de anticorpos específicos contra *A. vasorum*.

Assim, a separação e a purificação das proteínas que compõem o extrato solúvel de diferentes estádios deste parasito que possam funcionar como antígenos que identifiquem uma resposta sorológica no hospedeiro definitivo são de grande importância para aprimorar técnicas no diagnóstico afirmativo desta helmintose.

A cromatografia é um método que utiliza diversas técnicas de isolamento e purificação de uma amostra biológica e que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. Esta técnica é o método comumente usado para a obtenção de proteínas purificadas (COPELAND, 1994).

O desenvolvimento de técnicas e métodos de purificação de proteínas tem sido um pré-requisito essencial para muito dos avanços feitos na biotecnologia. A utilização de proteínas purificadas vem sendo difundida em testes de diagnóstico com o objetivo de aumentar a especificidade e sensibilidade.

3-OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Identificar e purificar proteínas de parasitos adultos de *A. vasorum* selecionando-as para o imunodiagnóstico da angiostrongilose canina pelo ELISA indireto.

3.2 - Objetivos Específicos

- Identificar as proteínas que compõem o antígeno total de larvas de primeiro estágio e parasito adulto de *A. vasorum*;
- Determinar por “Immunoblotting” os antígenos de L1 e de parasitos adultos que se ligam a anticorpos (IgG, IgA, IgE e IgM) e medir a frequência de reconhecimento das proteínas que interagem com estes anticorpos presentes no soro de cães experimentalmente infectados em diferentes fases da infecção;
- Verificar se há reações cruzadas com proteínas de L1 e de parasito adulto de *A. vasorum* com soros de cães naturalmente infectados com helmintos gastrointestinais *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*;
- Purificar, através de cromatografia de imunoafinidade, as proteínas de parasito adulto de *A. vasorum*;
- Padronizar o teste de ELISA para detecção de anticorpos específicos que reagem com as proteínas purificadas de *A. vasorum*;
- Avaliar a cinética de produção do anticorpo IgG no soro de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* utilizando as proteínas purificadas *A. vasorum*;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do ELISA utilizando proteínas purificadas de parasito adulto de *A. vasorum*.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Manutenção da Cepa de *Angiostrongylus vasorum*

A cepa de *A. vasorum* utilizada neste trabalho foi originalmente isolada das fezes de um cão naturalmente infectado, proveniente do Município de Caratinga – MG (LIMA *et al.*, 1985) e vem sendo mantida em laboratório através de passagens sucessivas em cães mantidos no Biotério de Cães do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) e em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* mantidos no moluscário do Departamento de Parasitologia.

4.1.1 - Recuperação de larvas de primeiro estágio (L1)

Para a recuperação de larvas de primeiro estágio (L1), foram coletadas amostras de fezes de cães experimentalmente infectados e mantenedores da cepa.

Após recolhidas, as fezes foram submetidas à realização do exame Baermann Moraes (BAERMANN & MORAIS, 1948), o qual consiste em um funil de vidro de 15 cm de diâmetro conectado a um tubo de hemólise através de uma mangueira de látex. As fezes foram pesadas, envolvidas com gaze cirúrgica e colocadas dentro do funil de vidro onde posteriormente foi adicionada água aquecida a 40°C. Após um período de 24 horas, o tubo de hemólise foi recolhido, centrifugado a 200g por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspensão em cinco mL de água de torneira e retiradas três alíquotas de 10 µl para a contagem de larvas em microscópio estereoscópio (25X). A quantidade de L1 por mL foi estimada por regra de três simples, utilizando à média das três alíquotas retiradas anteriormente. Após a contagem, as L1 foram armazenadas em alíquotas de 500 µl a -20°C até sua utilização.

4.1.2 - Infecção dos moluscos

As infecções dos moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* cedidos pelo Laboratório de Esquistossomose (ICB – UFMG) foram realizadas da seguinte forma:

Os moluscos foram colocados individualmente em placas de cultura de célula de seis poços (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EUA) onde foram colocados 1000 L1 de *A. vasorum* diluídas em 10 mL de água não tratada com cloro. As placas foram mantidas sob foco de luz com lâmpada de 60W a uma distância de 50 cm por 24 horas. Após este período, os moluscos foram transferidos para uma cuba de plástico, medindo 25 x 16x 10 cm, preenchida com um volume de 1 litro de água não tratada com cloro. As cubas foram mantidas à temperatura ambiente no moluscário do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. Os animais foram alimentados a cada três dias com alface fresca e a higienização das cubas foi realizada semanalmente.

4.1.3 - Recuperação de larvas de terceiro estágio (L3)

Os moluscos com 21 dias de infecção foram triturados em gral e pistilo de porcelana e, em seguida enrolados em gaze cirúrgica e submetidos ao aparelho de Baermann e Moraes por 24 horas. Após este período, o tubo de hemólise contendo as larvas de terceiro estágio foi centrifugado a 250g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de PBS 0,1M pH 7,2 retirando-se três alíquotas de 10µl para a contagem das larvas L3 utilizando microscópio estereoscópio (25X), as quais foram utilizadas na infecção experimental dos cães.

4.2-Animais

Foram utilizados 28 cães (*Canis familiaris*), sem raça definida, criados no Biotério de Cães do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG). A partir do 15º dia de idade, foram realizados exames de fezes de todos os animais e posteriormente foram vermifugados com três doses de anti-helmíntico polivalente e de largo espectro (144 mg de Pamoato de Pirantel, 50 mg de Praziquantel, 150 mg de Febantel – Drontal[®], Bayer, Belfortrocho, RJ, Brasil) com intervalos de 15 dias a fim de certificar a inexistência de infecções helmínticas persistentes. Após o término das vermifugações, foram realizados

três exames de fezes, em intervalos de três dias, pelo método de Sedimentação Espontânea (FERREIRA-NETO & MAGALHÃES, 1982) para pesquisa de ovos de helmintos e pelo método de Baermann para pesquisa de larvas de helmintos pulmonares. A partir do 30º dia de vida, os cães foram imunizados com vacina octoplavalente (Duramune[®], Fort Dodge) em três doses, com intervalos de vinte dias. Aos seis meses de idade, os cães receberam uma dose de vacina anti-rábica (Rai-Vac[®], Fort Dodge).

Os cães foram criados livres de *A. vasorum*, em compartimentos individualizados e cimentados. A higienização das celas e dos solários foi realizada diariamente com hipoclorito de sódio 1%. Os cães foram alimentados com ração comercial, conforme indicação do fabricante e água fresca *ad libitum*.

Trinta dias antes do início da realização dos experimentos, foram coletados, de todos os animais, 5 mL de sangue por punção da veia broncocefálica cranial, para realização de exames para pesquisa de leishmaniose visceral e babesiose canina.

4.2.1 - Infecção experimental

Os animais utilizados no experimento foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

O grupo A constituído por 20 animais infectados individualmente com 100 larvas infectantes/Kg de peso vivo (Kg/pv) ressuspensas em 5 mL de PBS 0,1M pH 7,2 com auxílio de uma seringa de 10mL. Os cães foram fisicamente contidos e infectados diretamente na porção final da cavidade bucal do animal, facilitando a deglutição.

O grupo B constituído por cinco animais correspondendo ao grupo controle onde todos os animais receberam um inóculo de 5 mL de PBS 0,1M pH 7,2.

O grupo C constituído por três animais infectados individualmente com 200 larvas infectantes/Kg de peso vivo (Kg/pv) ressuspensas em 5 mL de PBS 0,1M pH 7,2 com auxílio de uma seringa de 10mL, diretamente na porção final da cavidade bucal do animal para a recuperação de parasitos adultos.

Após a inoculação, os cães ficaram sob observação por um período de duas horas para certificar de que não ocorreu emese.

4.2.2- Coleta dos soros

No dia da infecção (dia zero) e aos 15, 30, 90, 180, e 210 dias após a infecção, os cães foram fisicamente contidos, e de cada animal foram coletados 5 mL de sangue através da punção da veia radial, utilizando sistema de coleta Vacuntainer® (Becton Dickinson).

Foram ainda utilizados soros de 60 cães não infectados por *A. vasorum* porém positivos para um ou mais helminto gastrintestinal dos gêneros *Toxocara*, *Dipylidium* e *Ancylostoma* que compõe a soroteca do Laboratório de Helminologia Veterinária do Instituto de Ciências Biológicas.

Esses animais foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte – MG (Anexo VIII). O diagnóstico destes cães foi realizado através de exames de fezes pelo método de Sedimentação para pesquisa de ovos de helmintos, pelo método de Baermann para pesquisa de larvas de helmintos pulmonares e posteriormente, realizada a necrópsia seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.3.

As amostras de sangue foram acondicionados em tubos de hemólise, centrifugados por dez minutos a 200 g para a obtenção do soro. O soro foi dividido em alíquotas de 200 µL e estocados em freezer a – 20°C para posterior realização dos testes imunológicos.

4.3 - Procedimento de Necrópsia

Para a recuperação de parasitos adultos foram utilizados os animais do Grupo C mencionado no item 4.2.1.

A partir do 35º dia de infecção, foram colhidas fezes dos animais, diariamente para a realização do exame de Baermann e para a determinação do período pré-patente, consequentemente comprovando a infecção.

Após a determinação do período pré-patente, os animais foram submetidos à eutanásia conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Animais de Experimentação (COBEA) e em concordância com a Lei n. 6.638 de 8 de maio de 1979

que estabelece normas práticas Didático-Científico da vivisseção de animais (Anexo VII). Todos os procedimentos relacionados à eutanásia, necrópsia e coleta de material foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e acompanhados de um Médico Veterinário.

Após exame geral macroscópico, foi retirado o conjunto cardíaco-pulmonar e colocado em um Pirex de vidro contendo PBS 0,1M pH 7,2. Cada órgão foi examinado individualmente fazendo observações de seu aspecto.

Para recuperação dos helmintos, o coração e pulmões foram separados e submersos em um Pirex de vidro contendo PBS 0,1M pH 7,2. As artérias pulmonares e suas ramificações foram abertas com o auxílio de tesoura de ponta fina. Os parasitos foram retirados com auxílio de um estilete e colocados em uma placa de Petri contendo PBS 0,1M pH 7,2. Posteriormente, os parasitos foram lavados em PBS estéril, colocados em tubos cônicos para micro-centrífuga e congelados em freezer à temperatura de -20°C , para posterior utilização no preparo de antígenos para o uso nos testes imunológicos.

4.4 - Identificação das Proteínas de *Angiostrongylus vasorum*

4.4.1 - Preparações de antígenos de L1 e de parasitos adultos

Para os procedimentos de identificação e transferência das proteínas foram utilizadas preparações contendo 16×10^5 L1 ou 600 parasitos adultos (machos e fêmeas). O material acondicionado conforme descrito nos itens 4.1.1 e 4.3 foi colocado em um tubo de centrífuga, ressuspenso em 5 mL de PBS 0,1M pH 7,2 contendo 20 μl de coquetel de inibidores de proteases (Complete Protease Inhibitor Cocktail – Boehringer Mannheim Biochemicals). Posteriormente, o material foi sonificado (potência de 20 W, frequência de 20 ondas ultrasonográficas por segundo, amplitude 4, potência máxima) em aparelho de ultra-som (Branson Sonc Power Company-Sonofer Cell Disruptor 450), em 05 ciclos de 30 segundos com intervalos de 01 minuto. Durante todo o processo, os tubos contendo L1 ou parasitos adultos foram mantidos em banho de gelo.

O material sonificado foi transferido para tubos de micro-centrífuga e centrifugado durante 30 minutos a 12000g, 4°C (Eppendorf Centrifuge 5410 – Brinkmann Instruments Inc. – Cantiaque) e posteriormente filtrado em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®), sendo denominado a seguir de antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio de *A. vasorum* (AgL1Av) e antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum* (AgPAAv).

O antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *T. canis* (AgPATc), *A. caninum* (AgPAAc) e *D. caninum* (AgPADc) foram obtidos seguindo o mesmo protocolo referido para *A. vasorum*.

A concentração total de proteínas nas amostras de antígenos foi estimada pelo método de LOWRY *et al* (1951) usando como padrão concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA). A seguir, o antígeno foi alíquotado e estocado à – 20°C.

4.4.2 - Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE)

A SDS-PAGE para a separação das proteínas que compõem o AgL1Av e AgPAAv foi realizada segundo LAEMMLI (1970). Foram testadas concentrações de proteínas de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL e 3 mg/mL.

O gel de separação a 10% de poliácridamida, para aplicação de amostra de L1 e 7,5%, para aplicação de amostra de parasito adulto (Anexo I) foi polimerizado entre duas placas de vidro mantidas a uma distância de 1 mm por meio de espaçadores de plástico. Após sua polimerização, foi aplicado o gel de concentração a 4% (Anexo I).

Após a padronização, as amostras de antígenos na concentração de 1 mg/mL foram diluídas em tampão de amostra 2X concentrado (Anexo I) fervidas a 100 °C por três minutos e aplicados em um mini-gel de canaleta única no aparelho Mini-Protean II (Bio Rad).

A corrida das proteínas foi conduzida a 30 mA e 100 V., à temperatura ambiente por aproximadamente 90 minutos.

Em todas as eletroforeses foram utilizados padrões de peso molecular (SIGMA, USA) composto de: Miosina (cadeia H) de 205kDa, β-Galactosidase de 116 kDa, Fosforilase b de 97,4kDa, Soro Albumina Bovina de 66kDa, Albumina de Ovo de 45kDa, anidrase carbônica de 29kDa e Tripsinogênio de 24 kDa.

4.4.2.1 - Coloração pelo azul de Coomassie

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi mantido por 15 minutos em solução corante de azul de Coomassie à temperatura ambiente (Anexo I), sob agitação. Em seguida, o gel foi submerso em uma solução descorante de proteínas (Anexo I), sendo mantido a temperatura ambiente sob agitação por um período de 5 minutos ocorrendo várias trocas da solução descorante até a visualização das bandas de proteínas.

4.4.3 – “Immunoblotting”

Para a identificação de proteínas do AgL1Av e AgPAAv foram utilizados soros de 10 animais pertencentes ao Grupo A no dia da infecção (dia zero), 15, 30, 90, 180 e 210 dias após a infecção, bem como 30 soros de animais naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* nas concentrações de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200.

A transferência das proteínas do gel (Mini-Protean II) para a membrana de nitrocelulose (SIGMA, MO, USA) foi realizada no aparelho Minitrans-Blot (Bio Rad). Os “sanduíches” para a transferência foram montados da seguinte forma: esponja “Scotch Brite”, quatro folhas de papel filtro, membrana de nitrocelulose mais quatro folhas de papel filtro e novamente esponja “Scotch Brite”. As esponjas assim como os papéis de filtro foram previamente umedecidas em tampão de transferência (Anexo II). Em seguida, o suporte de acrílico foi fechado e inserido na cuba de transferência (BIORAD). As transferências foram realizadas em temperatura ambiente por 18 horas a 30 V. e 40 mA, seguida de uma hora a 90 V.. O sucesso da transferência foi certificado pela coloração de parte da membrana com solução de Ponceau’s a 1 % (Anexo II) por um minuto e descoradas em água destilada para a visualização das proteínas transferidas e dos padrões de peso molecular.

A membrana foi bloqueada com PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 a 0,05% + Leite Mólico desnatado a 10% por 2 horas. Após este período, a membrana foi lavada três vezes por 10 minutos com PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 a 0,05% (Anexo II) sob agitação e recortada com auxílio de um bisturi em fitas de 0,3cm de largura. No momento dos testes, as fitas foram acondicionadas em canaletas plásticas separadoras, onde foram

adicionadas, em cada canaleta, concentrações pré-estabelecidas de soros de animais positivos e negativos para *A. vasorum* em diferentes fases da infecção, bem como soros de animais naturalmente infectados por outros helmintos diluídos em PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 a 0,05% + Leite Mólico desnatado 1% (Quadro 1). A seguir, a membrana foi colocada sob agitação lenta por 1 hora à temperatura ambiente.

Após este período, os soros foram retirados das canaletas e as fitas lavadas três vezes por 10 minutos com PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 a 0,05% sob agitação. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo conjugado com peroxidase, previamente diluído em PBS em concentrações previamente padronizadas que reconhece imunoglobulinas de cão (IgG, IgE, IgM ou IgA- Tabela 1) sob agitação e à temperatura ambiente. Decorrido o período de incubação, as membranas foram novamente lavadas três vezes por dez minutos com PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 a 0,05%, sendo que na última lavagem foi utilizado PBS 0,1M pH 7,2, sob agitação e incubadas com substrato (Anexo II) por aproximadamente 30 seg. a 60 seg. A reação foi interrompida colocando as fitas em água destilada por 5 minutos.

O peso molecular aproximado dos principais antígenos reconhecidos foi estimado por comparação com os padrões de peso molecular conhecidos utilizando gráficos de calibração conforme recomendações do fabricante (SIGMA-USA).

Quadro 1 - Protocolo para identificação de proteínas imunoreativas do antígeno bruto solúvel de larva (L1) e parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* utilizando soros de cães experimentalmente infectados.

	Procedimentos	Ag.L1	Ag. PA	Volume/Canaleta	Tempo
IgG	Diluição da amostra	1:100	1:100	1 mL de PBS-T + leite em pó desnatado 1%	60 min.
IgM		1:100	1:100		
IgA		1:50	1:50		
IgE		1:100	1:200		
Lavagem das canaletas – 2 mL PBS –T 0,05% (três vezes de 10 minutos)					
IgG	Diluição do anticorpo conjugado com peroxidase	1:1000	1:1000	1 mL de PBS 0,1M pH 7,2	60 min.
IgM		1:1000	1:1000		
IgA		1:500	1:500		
IgE		1:1000	1:2000		
Lavagem das canaletas – 2 mL PBS –T 0,05% (duas vezes de 10 minutos), sendo a terceira lavar em PBS pH 7,4					
	Revelação	(12 mg de 3,5 Diaminobenzidina diluídos em 12 mL de PBS e 06 mg de 4- Cloro – 1 naftol diluídos em 02 mL de metanol e 10 mL de PBS 0,1M pH 7,2) acrescentar 10 µL de Peróxido de Hidrogênio 30%		Aproximadamente 30 seg.- IgG,IgM,IgE 60 seg.- IgA	
	Interrupção da reação	Água destila por cinco minutos			

Ag. L1 – Antígeno de larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*

Ag. PA - Antígeno de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*

PBS-T Solução salina tamponada acrescida de Tween 20 a 0,05%

Quadro 2 – Painel de anticorpos utilizados nos testes imunológicos para detectar classes de imunoglobulinas presentes nos soros de cães infectados por *Angiostrongylus vasorum*, cães infectados por outros helmintos e cães controle.

Especificidade	Ac anti-Ig-Cão para Avaliação da Resposta Imune Humoral			
	Hospedeiro	Clone	Isotipo	Afinidade Molecular
IgA – HPRO	Camundongo	K117 1 ^A B	IgG2b	Cadeia α
IgG – HPRO	Cabra	-	-	Molécula Total
IgE - HPRO	Camundongo	E6-2 ^A 1	IgG2a	Cadeia ε
IgM – HPRO	Cabra	-	-	Cadeia μ

Todos os anticorpos foram produzidos pela Bethyl Laboratories, INC (Montgomery – Texas, EUA)

IgA-HPRO - α Imunoglobulina A conjugada com peroxidase

IgG-HRPO – Cadeia total de Imunoglobulina G conjugada com peroxidase

IgM-HRPO - γ Imunoglobulina M conjugada com peroxidase

IgE-HRPO - ε Imunoglobulina E conjugada com peoxidase

4.5 - Purificação dos Anticorpos Policlonais (PcAbs) anti-Angiostrongylus vasorum por Cromatografia de Imunoafinidade

A purificação dos PcAbs anti-*A. vasorum* teve como objetivo a eliminação de anticorpos inespecíficos visando posteriormente, a purificação de antígenos específicos de *A. vasorum*.

4.5.1 - Preparação da Sepharose CL 4B ligada a antígenos de parasito adulto de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Dipylidium caninum*

A purificação dos PcAbs anti-*A. vasorum* foi realizada em duas etapas: a primeira etapa consistiu da preparação de uma coluna de imunoafinidade Sepharose 4B ativada com Brometo de Cianogênio (Sepharose 4B-CNBr) ligada a antígenos de *T. canis*, *A. caninum*, *D. caninum* e soro de cães não parasitados.

Esses antígenos foram ligados á Sepharose 4B-CNBr de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia). Foram utilizados 3 g da resina Sepharose 4B – CNBr ressuspensa em HCl 1mM e centrifugada a 3000 g durante 15 minutos a 4°C por cinco vezes descartando o sobrenadante. Após esta etapa, a resina foi lavada com Tampão de ligação 0,1M pH 8,3 contendo NaCl 0,5M (Anexo III) e centrifugada duas vezes a 3000 g durante 15 minutos.

Aproximadamente 7 mg de proteínas de cada um dos três helmintos utilizados foram dialisados contra Tampão de ligação por 24 horas com três trocas do mesmo tampão. Os antígenos, juntamente com 100 µl de soro de cães não parasitados foram acrescidos simultaneamente à resina agitando lentamente em um agitador rotatório por duas horas à temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 3000 g por cinco minutos a 4°C. O controle da eficácia de ligação das moléculas a coluna foi feito pela leitura do sobrenadante a 280 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech). Em seguida, foi adicionada à resina Etanolamina 1M pH 8,0 (Anexo III) com a finalidade de bloquear dos sítios de ligação que permanecem ativos na resina, agitando lentamente em um agitador rotatório a temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, a resina foi colocada em uma coluna de 30 cm e lavada cinco vezes alternadamente com

20 mL de Tampão Acetato 0,1M pH 4,0 contendo NaCl 0,5 M e com Tampão de ligação (Anexo III).

4.5.2 - Purificação dos anticorpos policlonais anti-*Angiostrongylus vasorum*

A coluna de Sepharose 4B-CNBr ligada aos antígenos de *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* foi equilibrada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0 (Anexo III) e foram aplicados 20 mL de um “pool” de soros de 10 cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* (90 dias após a infecção) diluídos 1:2 em Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e filtrados em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®). Após a adição do soro, a coluna foi agitada lentamente em um agitador rotatório por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após recolher o soro aplicado contendo anticorpos específicos contra *A. vasorum*, as amostras foram dialisadas contra Tampão Tris-HCl 0,01M pH8,0 por 24 horas com três trocas do mesmo tampão e em seguida foram concentradas por liofilização. O liofilizado foi solubilizado em água Milli-Q, filtrados em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®) e armazenados em tubos de 15 mL a -20 °C. Posteriormente, a coluna foi lavada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0. A eluição dos PcAbs inespecíficos ligados aos antígenos insolúveis na resina foi realizada utilizando um Tampão de Eluição Pierce ImmunoPure® IgG Purification Buffer, onde foram coletados frações de 2 mL. O controle da eluição dos PcAbs inespecíficos foi feita pela leitura dos eluatos a 280 nm em espectrofotômetro. Após a coleta, a coluna foi regenerada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0.

4.5.3 - Preparação da coluna de Sepharose CL 4B ligada a antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*

A segunda etapa da purificação dos PcAbs anti-*A. vasorum* consistiu da preparação de uma nova coluna de imunoafinidade Sepharose 4B ativada com Brometo

de Cianogênio (Sephacrose 4B-CNBr) de acordo com o item 4.5.1 ligada a 20 mg de antígeno de parasito adulto de *A. vasorum*.

A coluna de Sepharose 4B-CNBr ligada ao antígeno de parasito adulto de *A. vasorum* foi equilibrada com 10 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0 e foi aplicado o soro contendo PcAbs específicos anti-*A. vasorum* purificado no item 4.5.2. Após a adição do soro, a coluna foi agitada lentamente em um agitador rotatório por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após recolher o soro aplicado contendo PcAbs inespecíficos, a coluna foi lavada com 10 mL de Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e 10 mL de Tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0. A eluição dos PcAbs específicos anti- *A. vasorum* ligados a resina foi realizada utilizando um Tampão de Eluição Pierce ImmunoPure® IgG Purification Buffer, onde foram coletados frações de 2 mL. O controle da eluição dos PcAbs foi feita pela leitura dos eluatos a 280 nm em espectrofotômetro. Após a coleta, a coluna foi regenerada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0. O “pool” das frações eluídas com leitura superior a 0,05 foram dialisadas contra Tris-HCl 0,01M pH8,0 por 24 horas com três trocas do mesmo tampão e em seguida foi concentrado por liofilização. O liofilizado foi solubilizado em água Milli-Q, filtrados em um filtro Millex HV de 0,25µm (Millipore®) e a concentração protéica foi determinada segundo LAYNE (1957), que consiste na $(\text{leitura a } 280\text{nm} \times 1,55) - (\text{leitura a } 260\text{nm} \times 0,76) \times \text{fator de diluição}$.

4.5.4 - Avaliação da especificidade dos anticorpos policlonais anti-*Angiostrongylus vasorum*

A especificidade dos PcAbs anti-*A. vasorum* purificados como descrito acima foi testada pelo método de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), segundo BARÇANTE (2004), com algumas modificações.

Para testar a especificidade dos PcAbs purificados na primeira etapa, as placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com AgPAAv, AgL1Av e AgPATc. Para os PcAbs purificados na segunda etapa, as placas de poliestireno foram sensibilizadas com AgPAAv, AgL1Av, AgPATc, AgPAAc e AgPADc na concentração de 5µg/mL diluídas em tampão de sensibilização (Anexo IV) e incubadas durante 18 horas à 4°C.

Após este período, o sobrenadante foi desprezado e as placas lavadas cinco vezes com PBS 0,1M pH 7,2 Tween 20 0,05% (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, Sigma) e em seguida foram adicionados 100µl/poço de uma solução de bloqueio (Anexo IV). A placa foi mantida durante 60 minutos em repouso a 37°C. Decorrido este período, a solução de bloqueio foi desprezada e a placa lavada.

Após a lavagem, foram adicionados em cada poço, 100µl de PcAbs purificados anti-*A. vasorum* nas diluições de 1:25, 1:53 e 1:203 em tampão de diluição (Anexo IV) bem como “pool” de soro de cinco cães do grupo controle e “pool” de soro de 10 cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* diluído 1:8000 em duplicata. A placa foi incubada durante 60 minutos a 37°C e após este período, o soro foi desprezado e a placa lavada cinco vezes com solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100µl/poço de anticorpo policlonal anti-IgG de cão conjugados a peroxidase (Bethyl®) diluído 1:5000 em tampão de diluição (Anexo IV).

A placa foi incubada durante 60 minutos em repouso, à 37°C e em seguida, lavada cinco vezes com solução de lavagem. Seguido a lavagem, foram adicionados 100 µl/poço da solução substrato-reveladora (Anexo IV). As placas foram incubadas em câmara escura durante 30 minutos a 37°C.

A reação foi interrompida adicionando 30µl /poço de H₂SO₄ 4N. Imediatamente após a interrupção da reação foi realizada a leitura, em absorbância, no leitor de ELISA (BIORAD 550) com filtro para comprimento de onda de 492 nm.

4.6 - Purificação de Proteínas Específicas de *Angiostrongylus vasorum* por Cromatografia de Imunoafinidade

4.6.1-Preparação da coluna de imunoafinidade contendo Proteína A ligada aos PcAbs purificados anti-*Angiostrongylus vasorum*

A purificação de proteínas imunogênicas de *A. vasorum* foi feita em coluna de imunoafinidade contendo Proteína A ligada aos PcAbs específicos contra *A. vasorum* purificados anteriormente.

Os PcAbs purificados foram ligados a Proteína A de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Pharmacia). Os PcAbs foram adicionados a resina em um coluna de 15 cm e incubados por 60 minutos em temperatura ambiente agitando lentamente em um agitador rotatório. Em seguida, a resina foi lavada duas vezes com 20 mL de Borato de Sódio 0,2M pH 9,0 (Anexo V) centrifugando a 3000 g por 5 minutos. Após esse período, foi descartado o sobrenadante e a resina foi ressuspensa com 20 mL de Borato de Sódio 0,2M pH 9,0 acrescida de Dimetilpimerimidato a uma concentração final de 20nM para ligar covalentemente os anticorpos IgG purificados à proteína A da resina agitando lentamente a temperatura ambiente em um agitador rotatório. A reação foi interrompida lavando a resina uma vez com Etanolamina 0,2M pH 8,0 com a finalidade de bloquear os sítios reativos na resina (Anexo III) e posteriormente incubada por 2 horas agitando lentamente a temperatura ambiente em um agitador rotatório. Após, a resina foi lavada com Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0.

4.6.2 - Purificação das proteínas de antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*

A coluna de Proteína A ligada aos PcAbs IgG purificados anti-*A. vasorum* foi equilibrada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0 e o antígeno de parasito adulto de *A. vasorum* na concentração de 30mg de proteína foi aplicada a coluna. Após a adição do antígeno, a coluna foi agitada lentamente por 30 minutos a temperatura ambiente.

Após recolher o antígeno inespecífico, a coluna foi lavada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,01 M pH 8,0. A eluição dos antígenos específicos de *A.vasorum* acoplados a resina foi realizada utilizando um Tampão de Eluição Piece ImmunoPure® IgG Purification Buffers, onde foram coletados frações de 2 mL. O controle da eluição foi feito pela leitura dos eluatos a 280 nm em espectrofotômetro. Após a coleta, a coluna foi regenerada com 20 mL de Tampão Tris-HCl 0,1M pH8,0. O “pool” das frações eluídas com leitura superior a 0,05 foram dialisadas contra Tris-HCl 0,01M pH8,0 por 48 horas com seis trocas do mesmo tampão e em seguida foi concentrado por liofilização. O liofilizado foi

solubilizado em água Milli-Q e a concentração protéica foi estimado pelo método de LOWRY *et al* (1951) usando como padrão concentrações conhecidas de soro albumina bovina (BSA) e estocado a - 80°C até a sua utilização.

Para avaliar a eficiência da purificação, as proteínas purificadas foram visualizadas por eletroforese.

4.6.2.1 - Coloração do gel de poliacrilamida por Nitrato de Prata

O gel foi fixado em Metanol a 30%, Ácido Acético 10% e água destilada 60% (Anexo VI) e lavado por cinco minutos com água destilada sob agitação. Após a lavagem, o gel foi incubado em solução de Dicromato de Potássio (Anexo VI) por cinco minutos sob agitação e novamente lavado com água destilada. Após este período, o gel foi incubado em solução de prata amoniacal (Anexo VI) por 20 minutos, sob agitação e lavado rapidamente em água destilada.

Nos últimos cinco minutos de incubação, a solução reveladora (Anexo VI) foi preparada e adicionada sobre o gel. A revelação foi feita sob agitação manual e interrompida com a solução fixadora (Anexo VI) quando a coloração adequada foi atingida.

4.7 - Avaliação da especificidade das proteínas purificadas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*

A cinética de produção de anticorpos presentes no soro de animais experimentalmente infectados que reagiram especificamente com as proteínas purificadas foi avaliada pelo método de ELISA indireto.

A concentração das proteínas purificadas de *A. vasorum* foi padronizada testando concentrações diferentes de proteínas (0,1µg/mL 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 5µg/mL) diluídas em tampão carbonato. Foram utilizados soros de 20 animais pertencentes ao Grupo A no dia da infecção (dia zero) e aos 15, 30, 90, 180 e 210 dias após a infecção nas diluições de 1:50, 1:100, 1:1000, 1:7500 combinadas com diferentes

diluições de anticorpo policlonal anti-IgG de cão conjugados a peroxidase (Bethyl[®]) segundo recomendações do fabricante. Para a utilização do bloqueio e no tampão de diluição foram testadas duas diferentes soluções como bloqueio e na diluição dos anticorpos: soro albumina bovina (BSA, Inlab) e Caseína (Sigma). As placas de poliestireno foram sensibilizadas por dois períodos diferentes: 3 horas a 37°C e durante 18 a 24 horas a 4°C.

Para verificar a sensibilidade e especificidade do teste de ELISA utilizando proteínas purificadas de *A. vasorum* bem como antígeno bruto solúvel de *A. vasorum*, foram testados os soros de 60 cães consistentemente negativos para *A. vasorum*, porém positivos para um ou mais helmintos gastrointestinais dos gêneros *Toxocara*, *Ancylostoma* e *Dipylidium* oriundos da soroteca do Laboratório de Helminologia Veterinária (ICB-UFMG).

4.7.1 - Cálculo do limite de detecção

A separação entre animais positivos e negativos foi realizada comparativamente com soros de 10 animais sabidamente negativos para infecção por *A. vasorum*.

O limite de detecção, que representa o limiar entre a absorvância de animais negativos e positivos foi à média das absorvâncias de dez animais controle negativo somada a três vezes o valor do desvio padrão das amostras.

4.8 - Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados neste estudo foram realizados por meio do programa *SPSS 15.0 for Windows*. A absorvância média dos soros de animais negativos e positivos para *A. vasorum* e dos soros de animais infectados por outras helmintoses foram analisados pelo teste de ANOVA seguida do teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,05$.

4.8.1 - Cálculo da Sensibilidade e Especificidade

Os cálculos de sensibilidade e especificidade (SOARES & SIQUEIRA, 1999) foram realizados baseando-se nas fórmulas abaixo:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros Positivos (VP)}}{\text{Verdadeiros Positivos (VP)} + \text{Falsos Negativos (FN)}} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{\text{Verdadeiros Negativos (VN)}}{\text{Verdadeiros Negativos (VN)} + \text{Falsos Positivos (FP)}} \times 100$$

5-RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1 – Separação das Proteínas de L1 de *Angiostrongylus vasorum* por Eletroforese

O antígeno bruto solúvel de L1 analisado por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida concentração de 10%, revelou proteínas com peso molecular aproximado de 17 a 207 kDa (Fig.1).

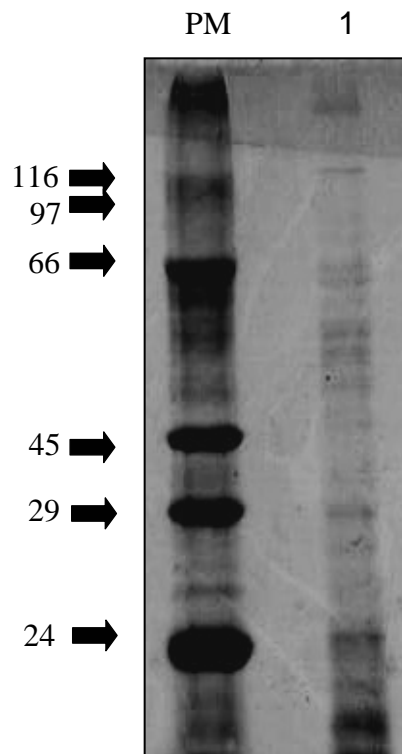


Figura 1 – Análise eletroforética do antígeno bruto solúvel de larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* analisado em gel de poliacrilamida com redução na concentração de 10% corado pelo Azul de Coomassie.

PM - Padrão de peso molecular.

1-Antígeno bruto solúvel de primeiro estágio

5.2 – Separação das Proteínas de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum* por Eletroforese

O antígeno bruto solúvel de parasito adulto analisado por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida na concentração de 7,5%, revelou proteínas com peso molecular aproximado de em 28 a 210 kDa (Fig.2).

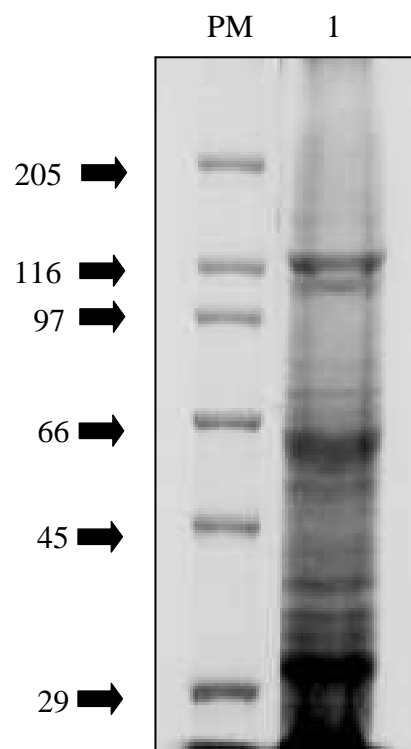


Figura 2 – Análise eletroforética do antígeno bruto solúvel do parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* analisado em gel de poliacrilamida com redução na concentração de 7,5% corado pelo Azul de Coomassie.

PM - Padrão de peso molecular.

1-Antígeno bruto solúvel de parasito adulto.

5.3 – “IMMUNOBLOTTING”

5.3.1 – Identificação de proteínas de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG

O antígeno bruto solúvel de L1 de *A. vasorum* apresentou proteínas com peso molecular aproximado de 18 a 118 kDa que foram reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG (Tabela 2). Os anticorpos IgG anti- *A. vasorum* reagiram com as proteínas de L1 a partir do 15º dia pós infecção (DPI) até o final do período experimental. Porém a frequência diminuiu durante o decorrer do experimento, permanecendo as proteínas de 28 kDa, 39 kDa, 51 kDa, 57 kDa e 65 kDa que foram reconhecidas com maior frequência pelos anticorpos IgG durante todo o período experimental (Fig. 3).

Anticorpos do isotipo IgG de 30 cães naturalmente infectados por helmintos gastrointestinais como *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e negativos para *A. vasorum* não reconheceram as proteínas de L1 de *A. vasorum*.

O antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum* apresentou proteínas com peso molecular aproximado de 49 a 209 kDa, que foram reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG (Tabela 3). As proteínas de peso molecular aproximado de 51 kDa, 63 kDa, 92 kDa, 176 kDa e 209 kDa foram as proteínas reconhecidas com maior frequência pelos anticorpos do isotipo IgG (Fig. 4), permanecendo elevada até o final do período experimental.

Soros de 30 cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e negativos para *A. vasorum* apresentaram fraca reatividade com as proteínas de parasitos adultos de *A. vasorum*, sendo que 100% desses cães reconheceram a proteína de 49 kDa, 30% reconheceram a proteína de 96 kDa e 20% reconheceram as proteínas de 75 e 176 kDa (Fig. 5).

Tabela 1 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgG presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larvas de primeiro estágio (L1).

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
18	00	07	06	06	03	03
28	00	10	10	09	10	10
31	00	03	03	03	03	03
34	00	03	03	03	02	02
39	00	08	08	08	08	08
45	00	07	07	07	05	05
51	00	08	08	08	08	08
57	00	10	10	10	09	08
63	00	09	09	09	07	02
65	00	10	10	10	10	10
70	00	06	06	06	04	03
118	00	10	10	10	06	05

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

N - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

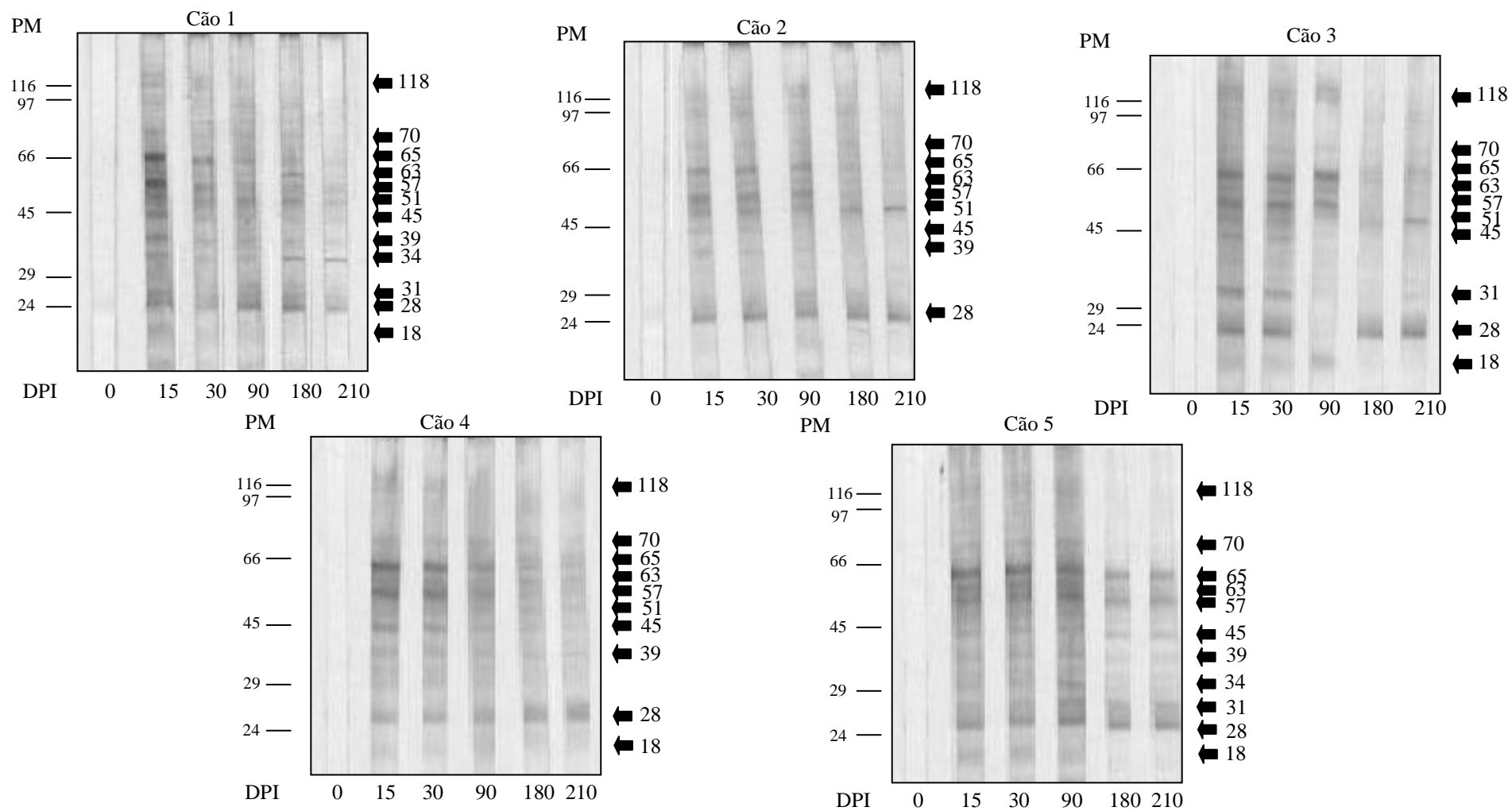


Figura 3 - Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM=Peso Molecular

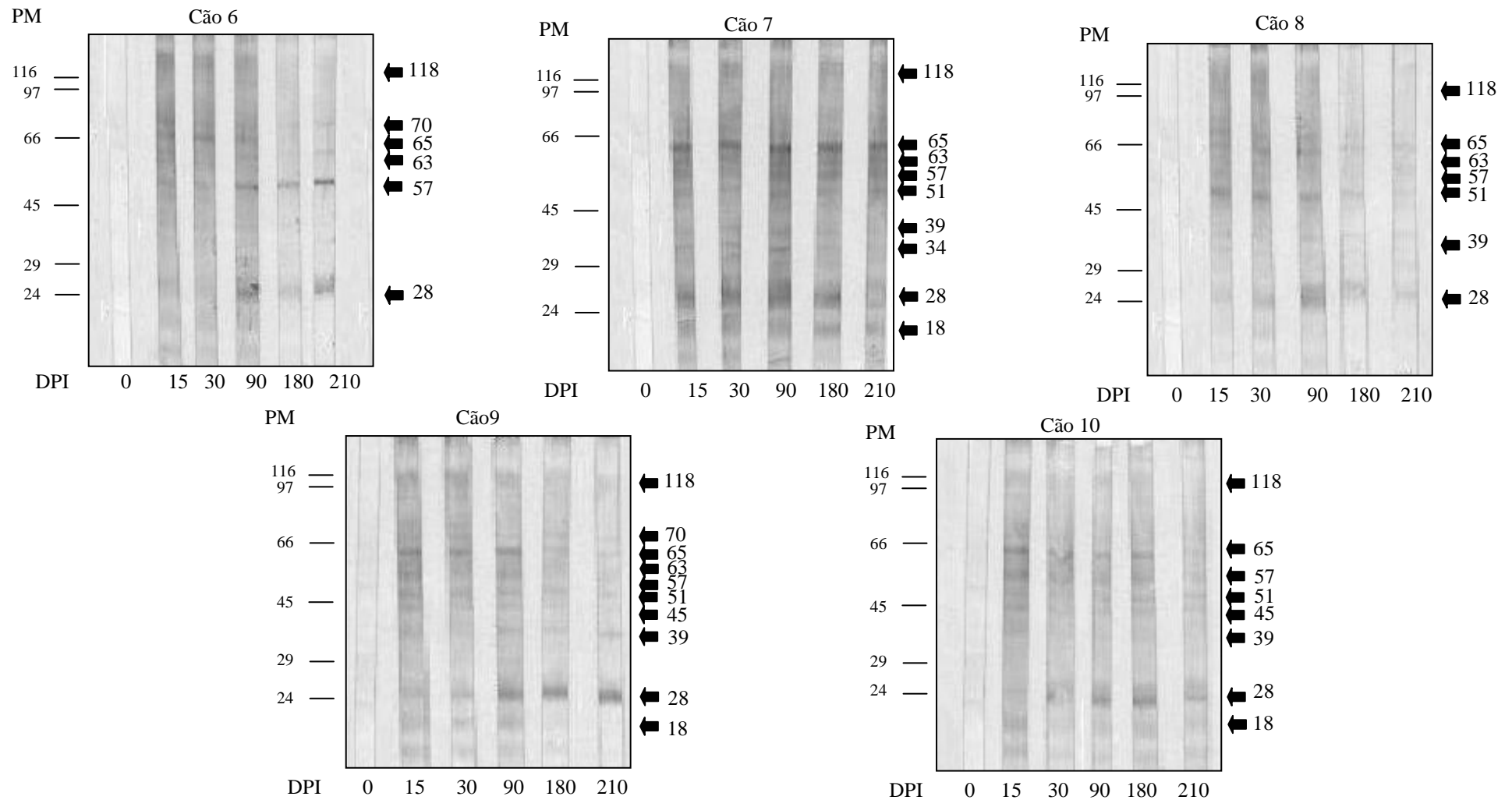


Figura 3 – Continuação- Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção.

DPI= Dias após infecção PM=Peso Molecular

Tabela 2 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgG presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
49	10	02	02	02	01	01
51	00	10	10	10	10	09
56	00	00	00	01	01	01
63	00	10	10	10	09	09
92	00	08	09	09	09	08
96	02	04	04	04	03	03
111	03	02	02	02	02	02
128	00	01	01	01	00	00
176	02	07	07	07	09	09
197	01	05	05	04	03	03
209	00	09	09	10	09	09

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

N - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

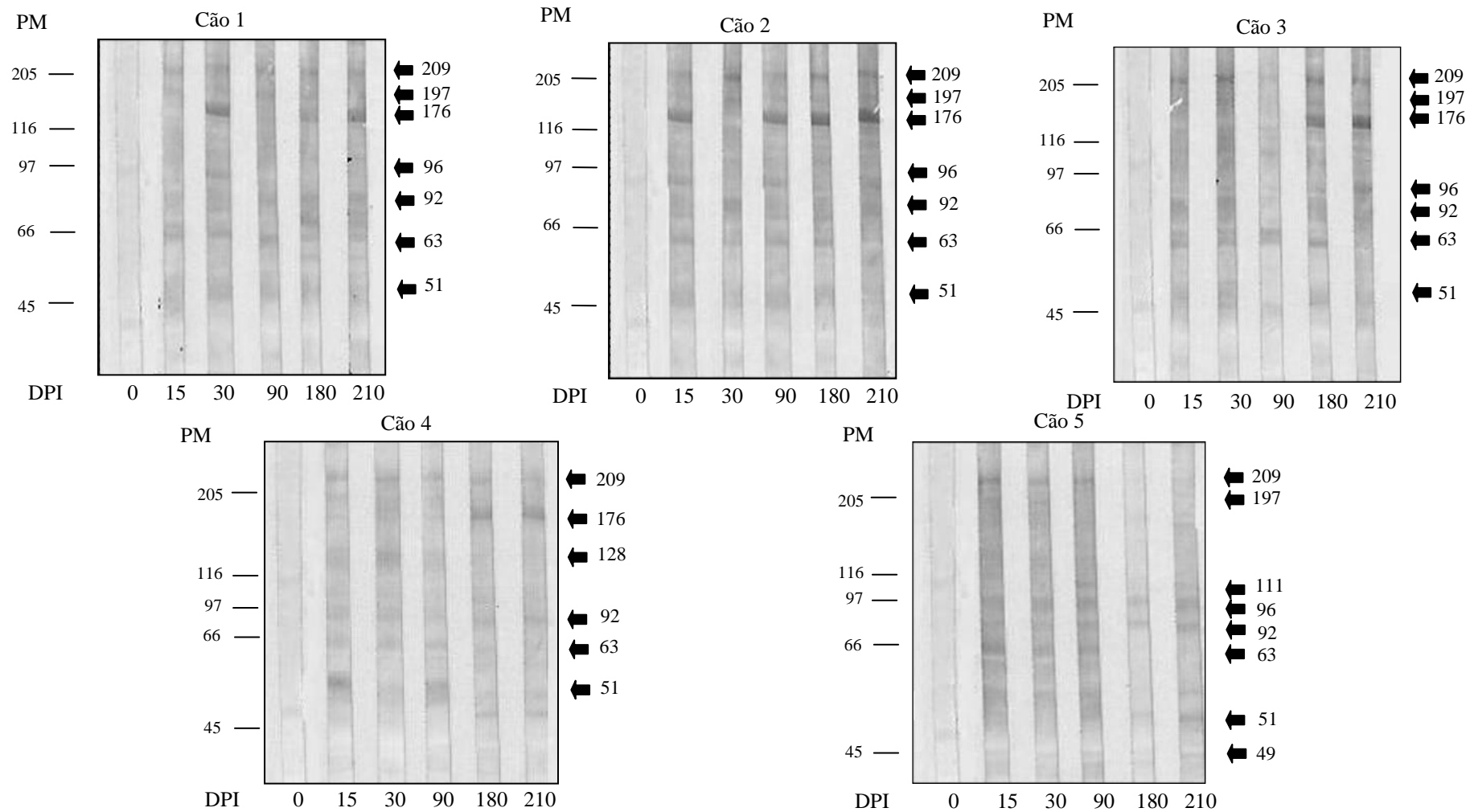


Figura 4 – Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

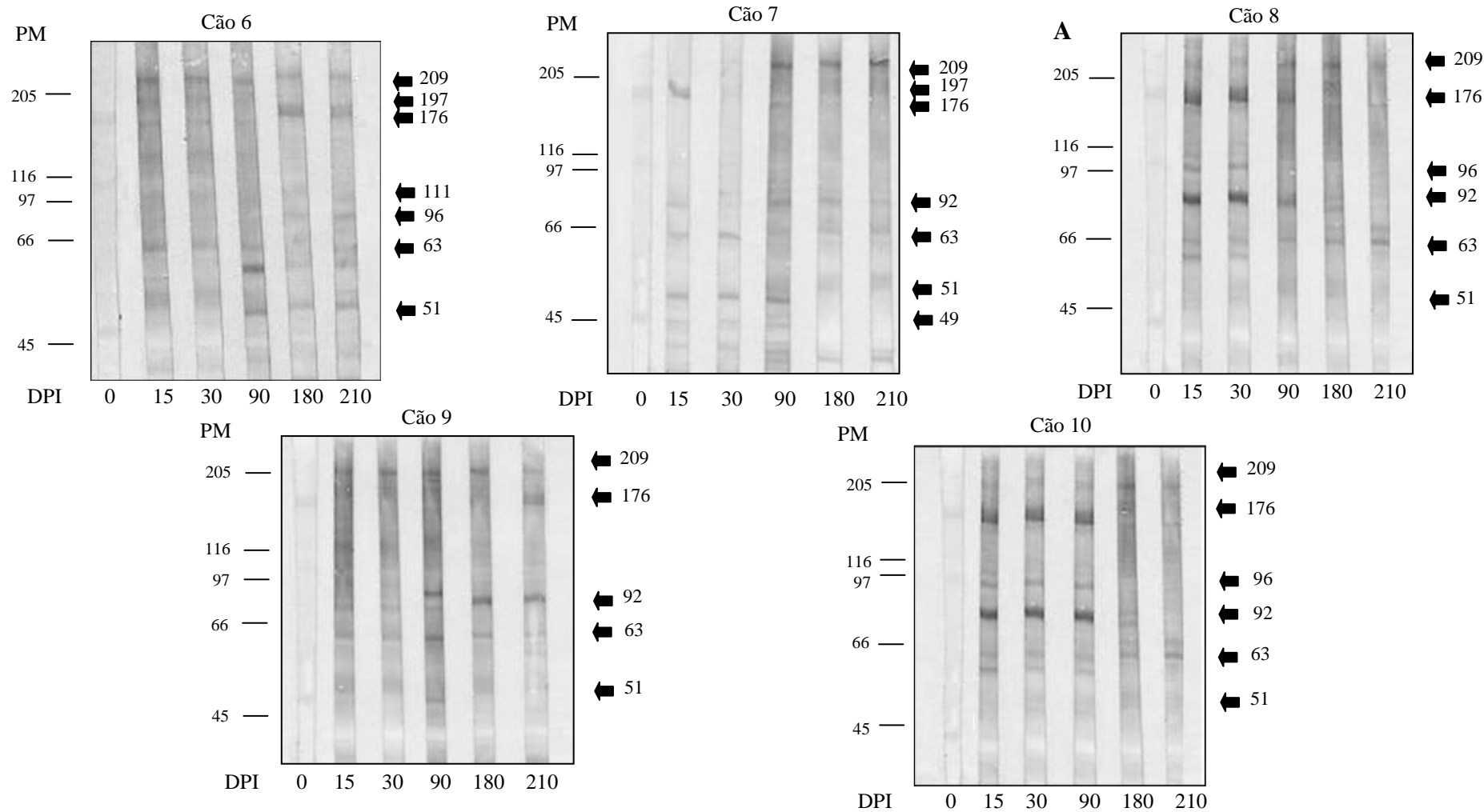


Figura 4 – Continuação-Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

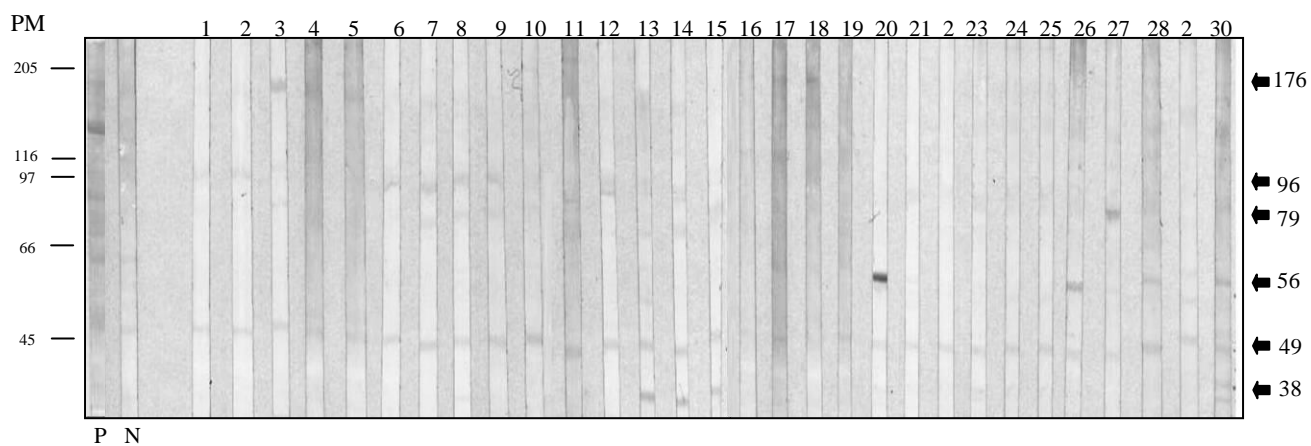


Figura 5 - Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgG presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*.

P= Controle positivo

N= Controle negativo

PM= Padrão de peso molecular

5.3.2 – Identificação de proteínas de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM

Onze proteínas de L1 com peso molecular aproximado de 18 kDa a 118 kDa foram reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM de cães infectado por *A. vasorum* (Tabela 4). No 15º dia após a infecção, foi observada uma maior reatividade dos anticorpos do isotipo IgM pelas proteínas de L1 de peso molecular aproximado de 18 kDa, 28 kDa, 45 kDa, 57 kDa, 63 kDa, 65 kDa, 70 kDa, 111 kDa e 118 kDa. A partir do 30º dia após a infecção ocorreu uma diminuição desta reatividade que se estendeu até o final do período experimental, destacando-se somente as proteínas de 63 kDa, 65 kDa e 70 kDa (Fig.6). Anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* não reconheceram antígenos de L1 de *A. vasorum*.

Anticorpos do isotipo IgM de cães infectados com *A. vasorum* reconheceram sete proteínas principais de parasito adulto (Tabela 5). Proteína de peso molecular aproximado de 51 kDa foi reconhecida mais frequentemente 30 dias após a infecção. Adicionalmente, proteínas de 51 kDa, 57 kDa e 63 kDa foram reconhecidas com maior frequência após 90 dias de infecção (Fig.7).

IgM de 30 cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e negativos para *A. vasorum* reagiram com proteínas de parasitos adultos de *A. vasorum*, sendo que 56,33% desses cães reconheceram a proteína de 70 kDa e 33,33% reconheceram a proteína de 176 kDa (Fig. 8).

Tabela 3 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgM presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
18	00	07	00	00	00	00
28	00	07	02	03	00	00
31	00	06	05	03	00	00
39	00	04	02	01	00	00
45	00	07	06	02	03	00
57	00	07	07	07	04	01
63	04	10	10	09	09	08
65	05	10	10	10	10	10
70	00	10	10	10	10	10
111	00	07	07	02	01	01
118	00	07	06	01	00	00

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

N - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

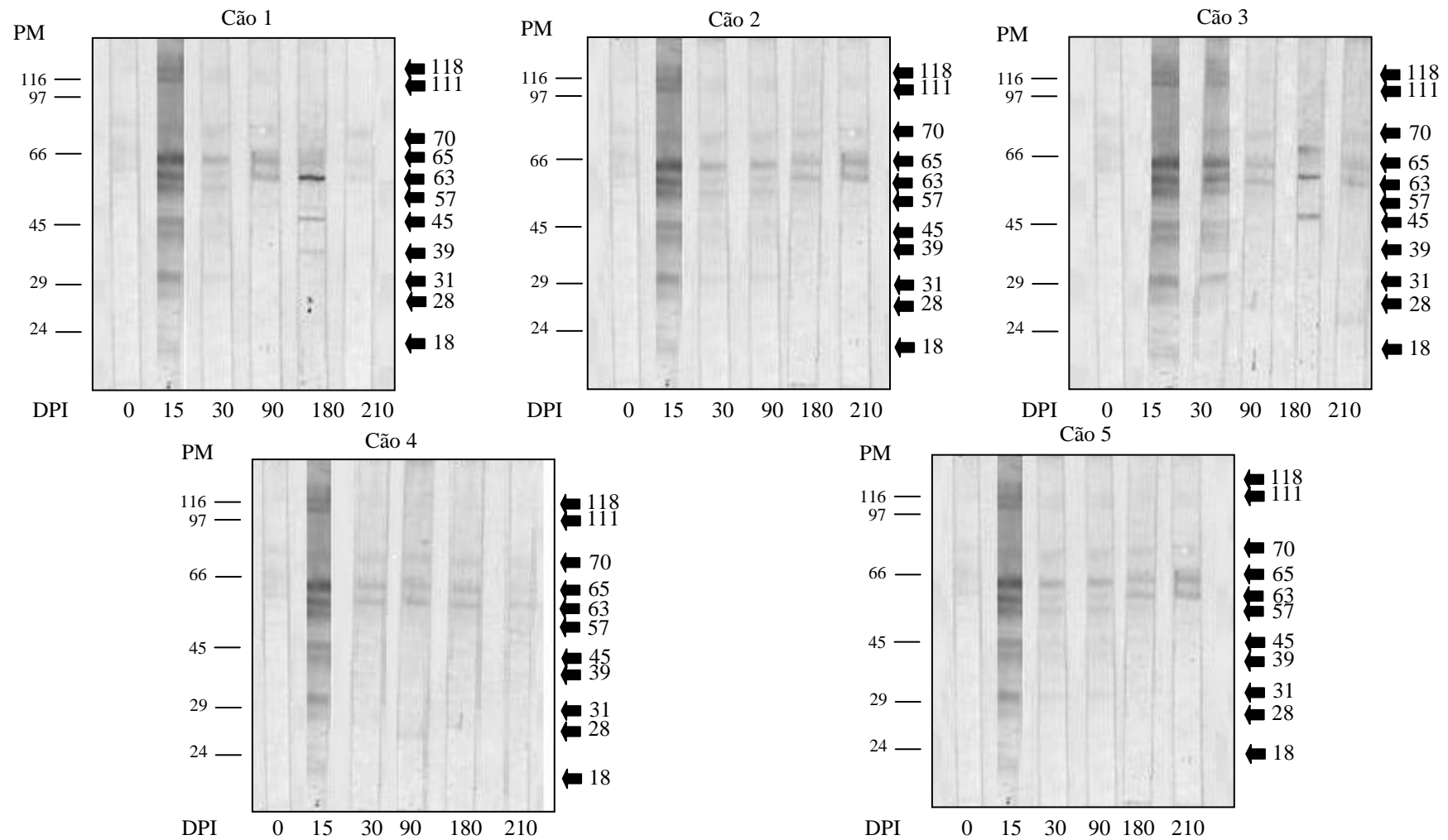


Figura 6 – Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

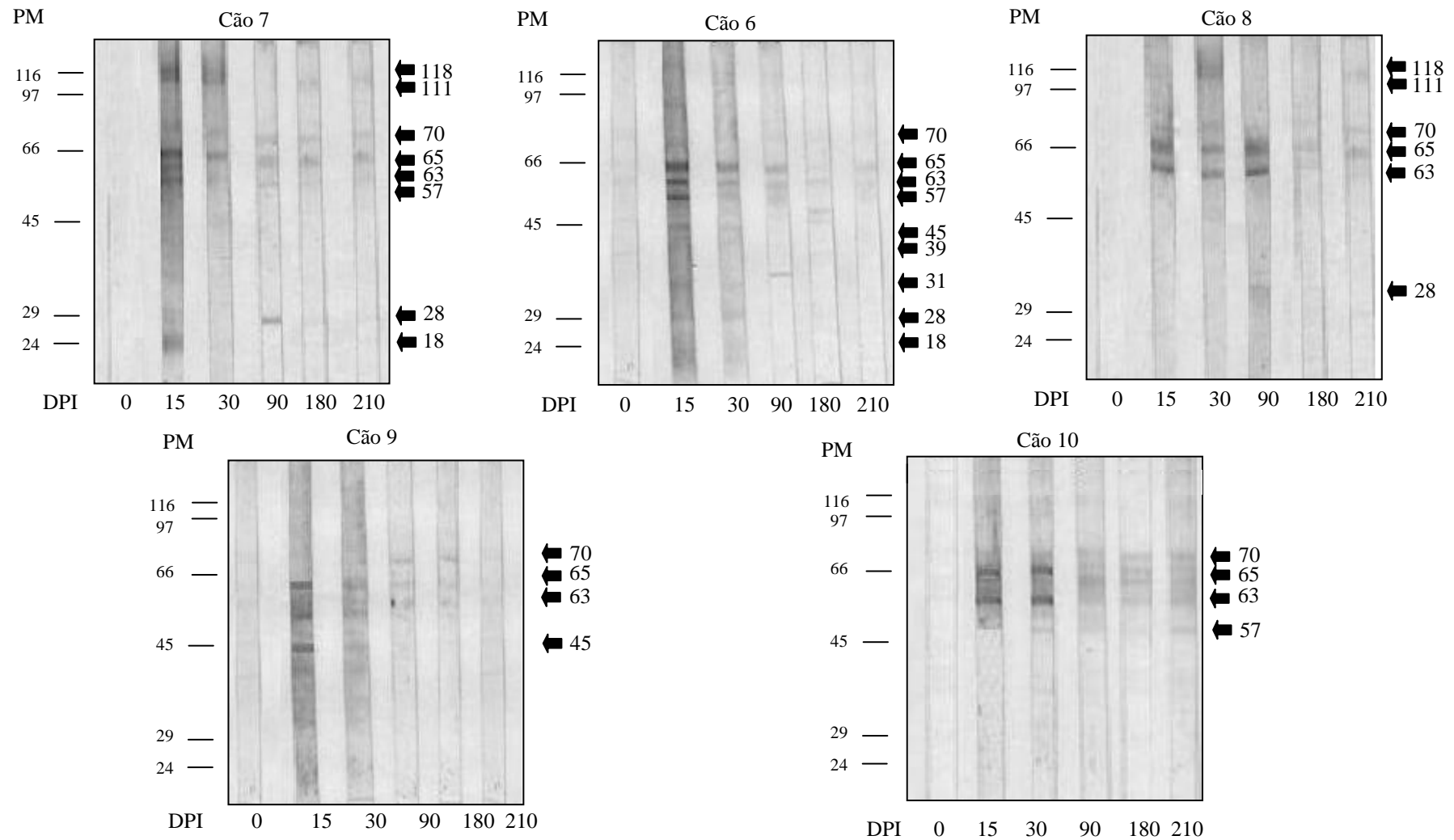


Figura 6 – Continuação- Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção.

DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

Tabela 4 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgM presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
51	05	09	10	07	07	08
57	06	05	05	07	10	09
63	05	04	05	07	08	08
65	00	04	05	02	03	04
96	07	04	05	06	05	05
111	03	02	03	03	01	01
176	01	04	04	04	04	06

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

n - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

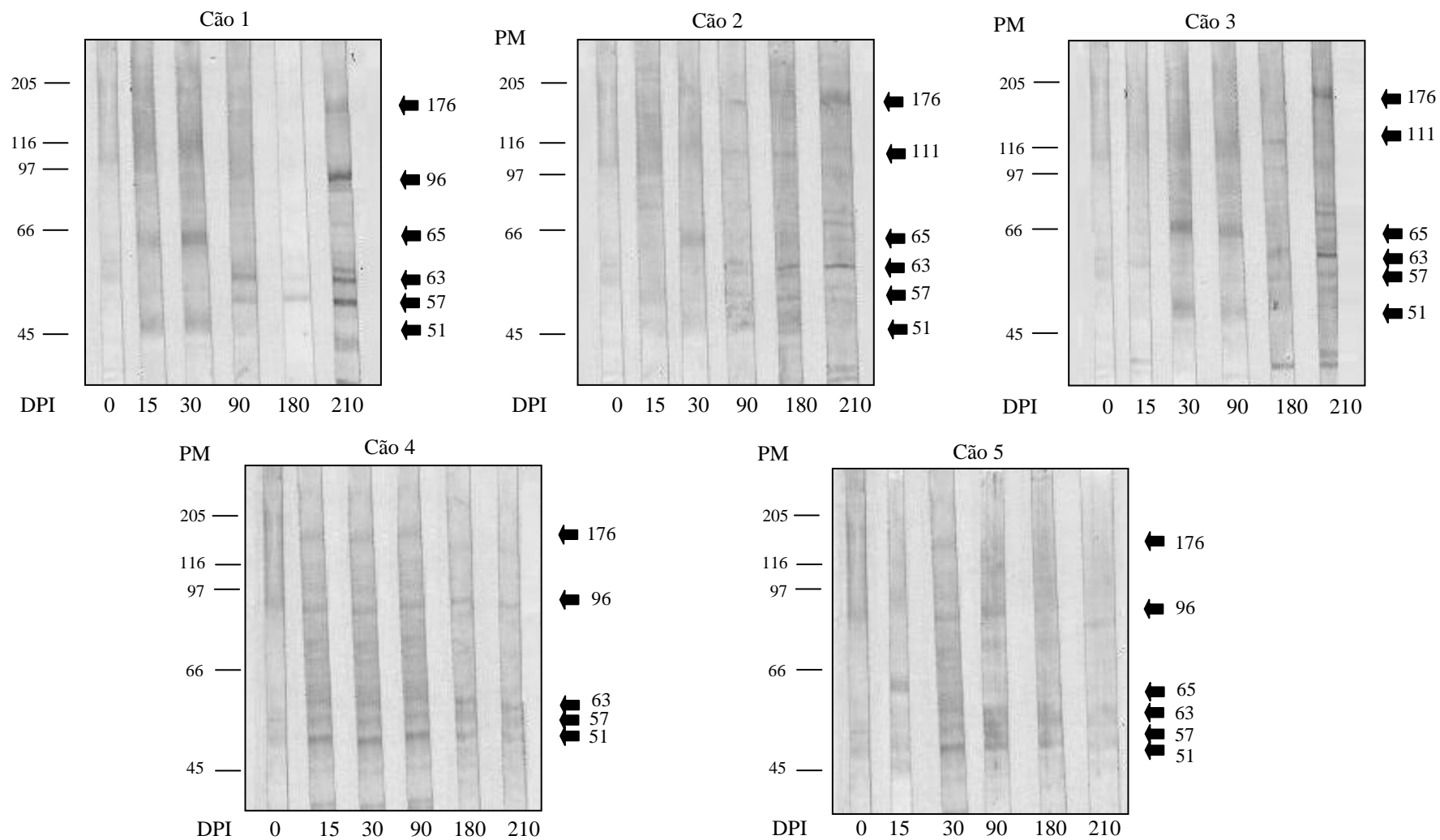


Figura 7 – Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

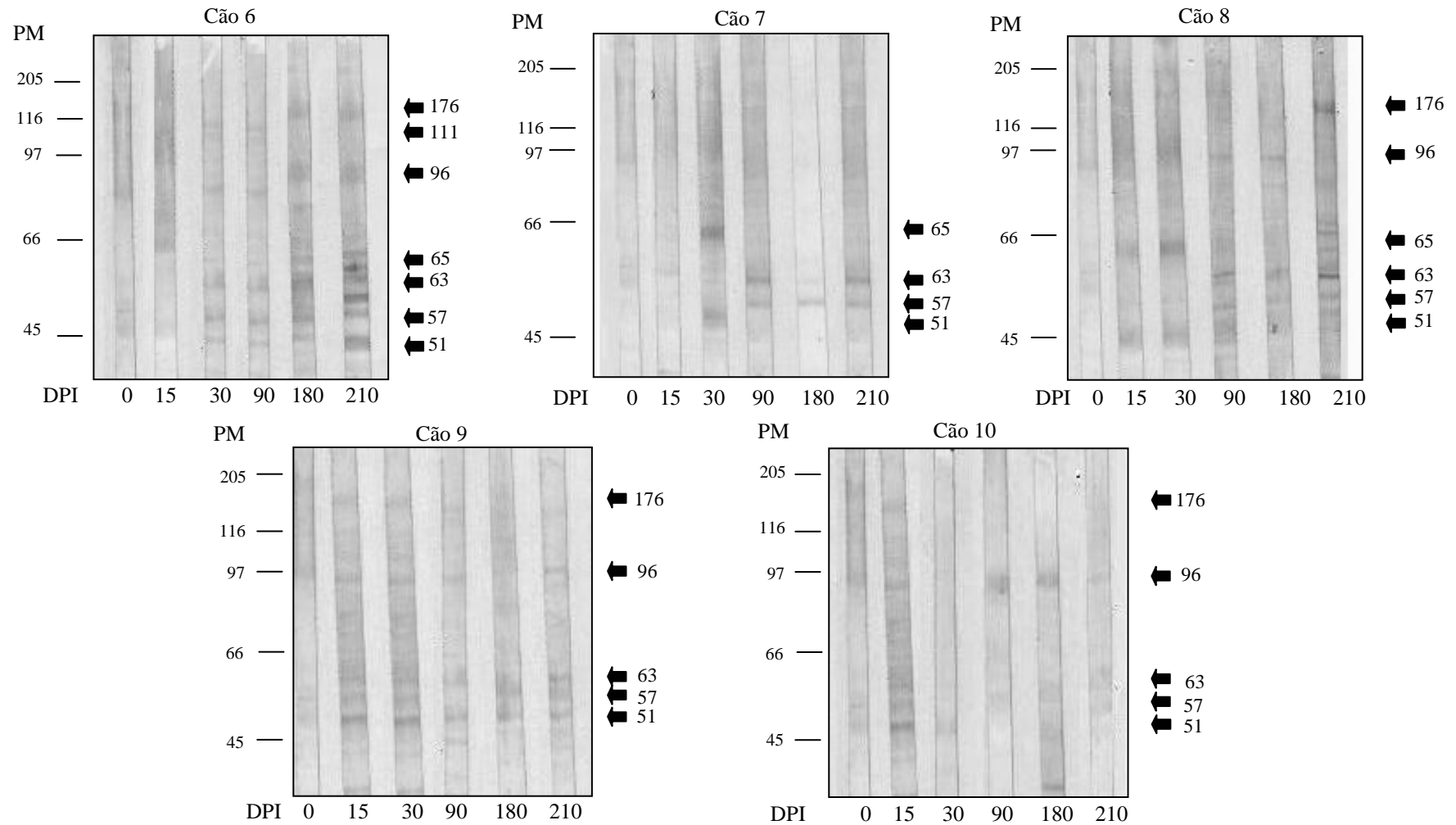


Figura 7 – Continuação - Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

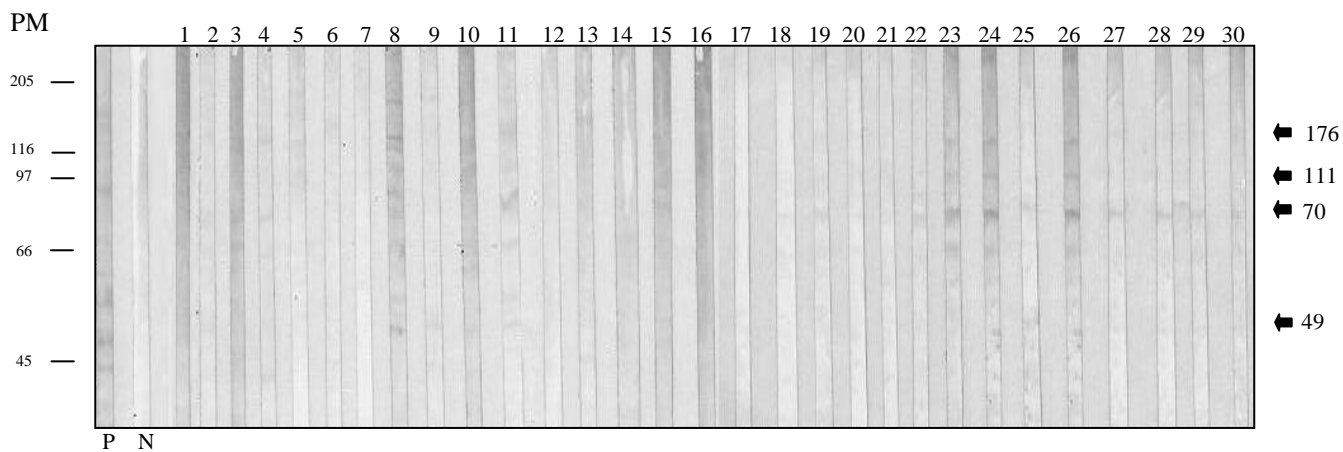


Figura 8 - Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgM presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* .

P= Controle positivo

N= Controle negativo

PM= Padrão de peso molecular

5.3.3 – Identificação de proteínas de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA

Foram reconhecidas seis proteínas de L1 com peso molecular aproximado de 18 a 111 kDa (Tabela 6). Proteínas de 63 kDa e 65 kDa foram reconhecidas com maior frequência entre 15 e 30 dias após a infecção. Entretanto, aos 30 dias após a infecção a reatividade dos anticorpos IgA foi reduzida (Fig.9). Anticorpos IgA presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* não reconheceram antígenos de L1 de *A. vasorum*.

Foram reconhecidas sete proteínas de parasito adulto com peso molecular aproximado de 51 kDa a 198 kDa (Tabela 7). A proteína de peso molecular aproximado de 51 kDa foi reconhecida com maior frequência a partir do 15º dia após a infecção e a proteína de 65 kDa a partir do 90º dia após a infecção (Fig. 10).

IgA de cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e negativos para *A. vasorum* reagiram com proteínas de parasitos adultos de *A. vasorum*, sendo que 100% desses cães reconheceram as proteínas de 176 kDa, 151 kDa, 96 kDa, 57 kDa e 49 kDa (Fig.11).

Tabela 5 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgA presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
18	00	01	00	00	00	00
28	00	07	05	07	05	04
45	00	05	04	00	00	00
63	00	09	08	05	07	07
65	00	10	08	05	04	05
111	00	06	05	04	01	01

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

n - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

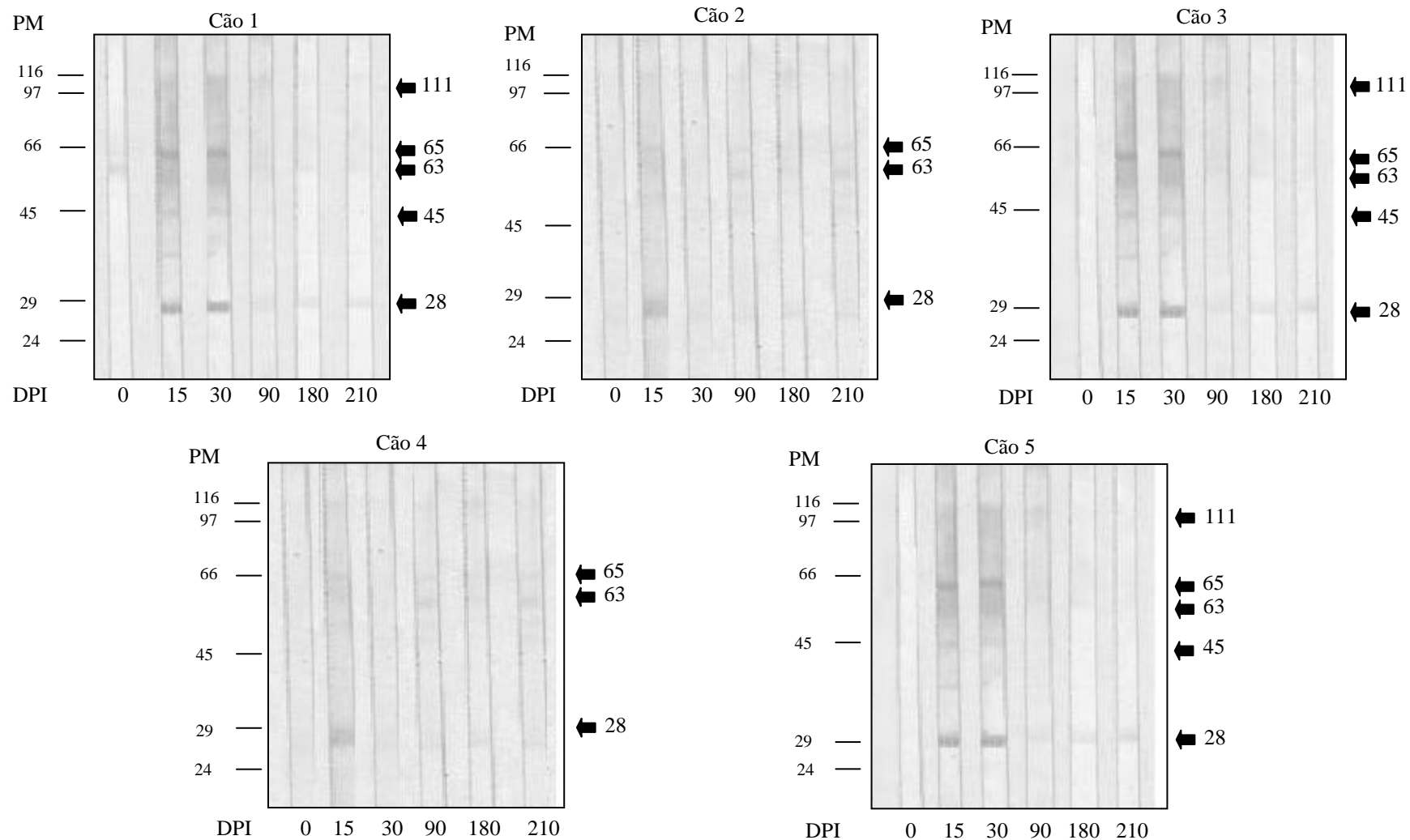


Figura 9 - Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

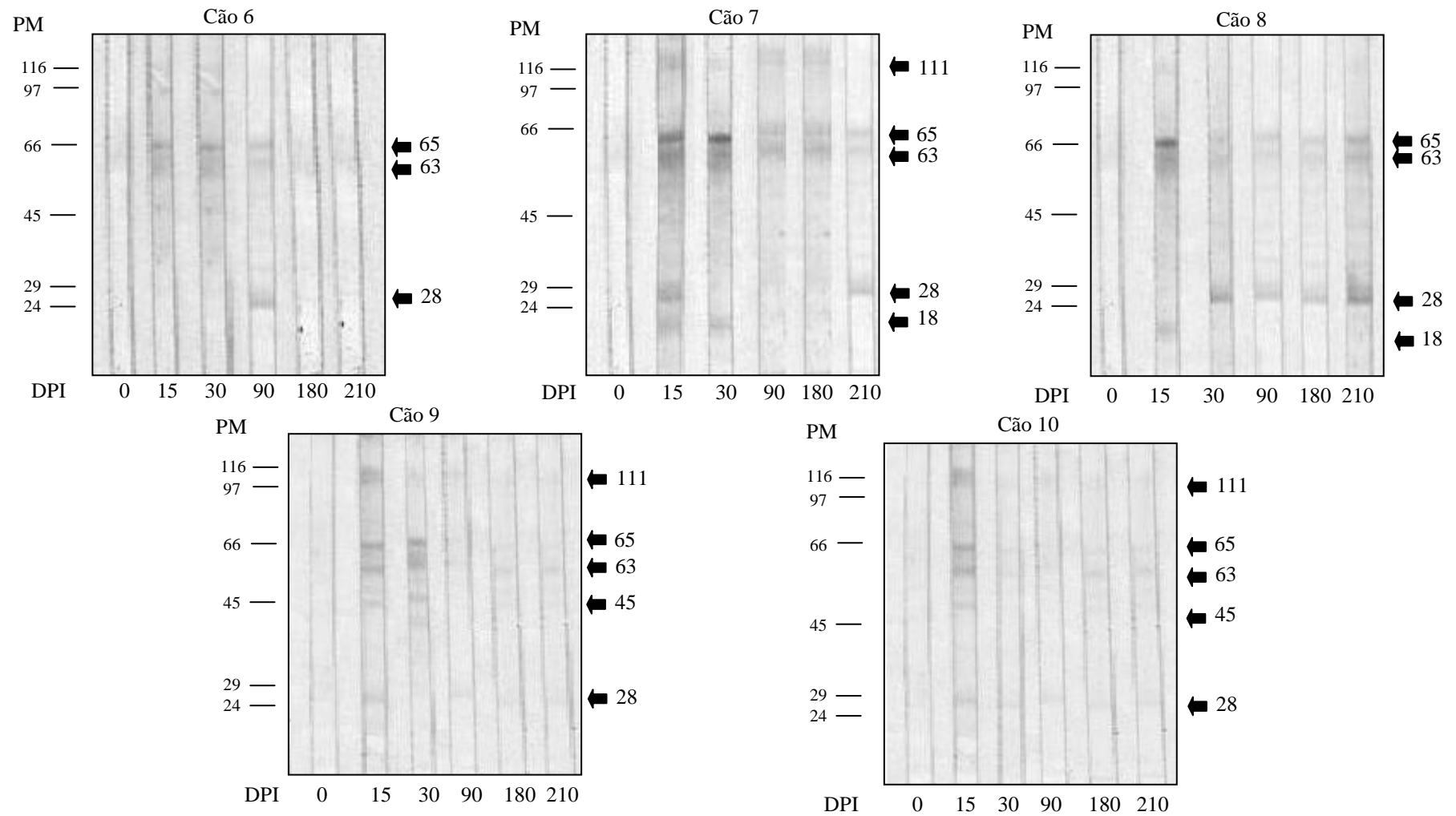


Figura 9 – Continuação - Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção.

DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

Tabela 6 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgA presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de parasito adulto.

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
51	00	09	09	10	10	10
63	03	04	04	06	05	05
65	00	05	06	08	07	07
92	00	06	06	06	06	07
111	00	03	04	04	04	05
176	00	05	05	04	07	07
198	00	00	00	01	01	01

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

n - Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

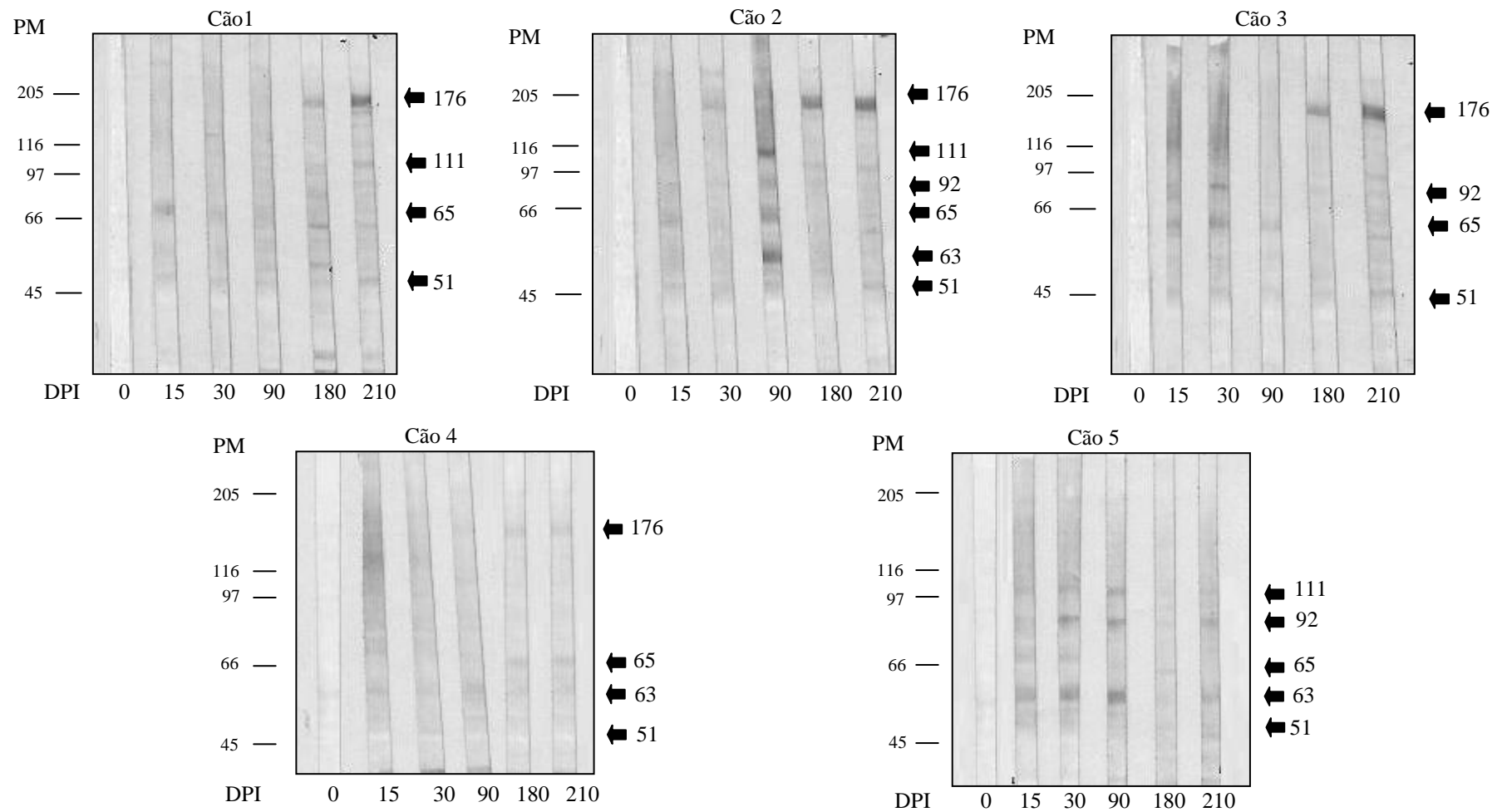


Figura 10 – Continuação - Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

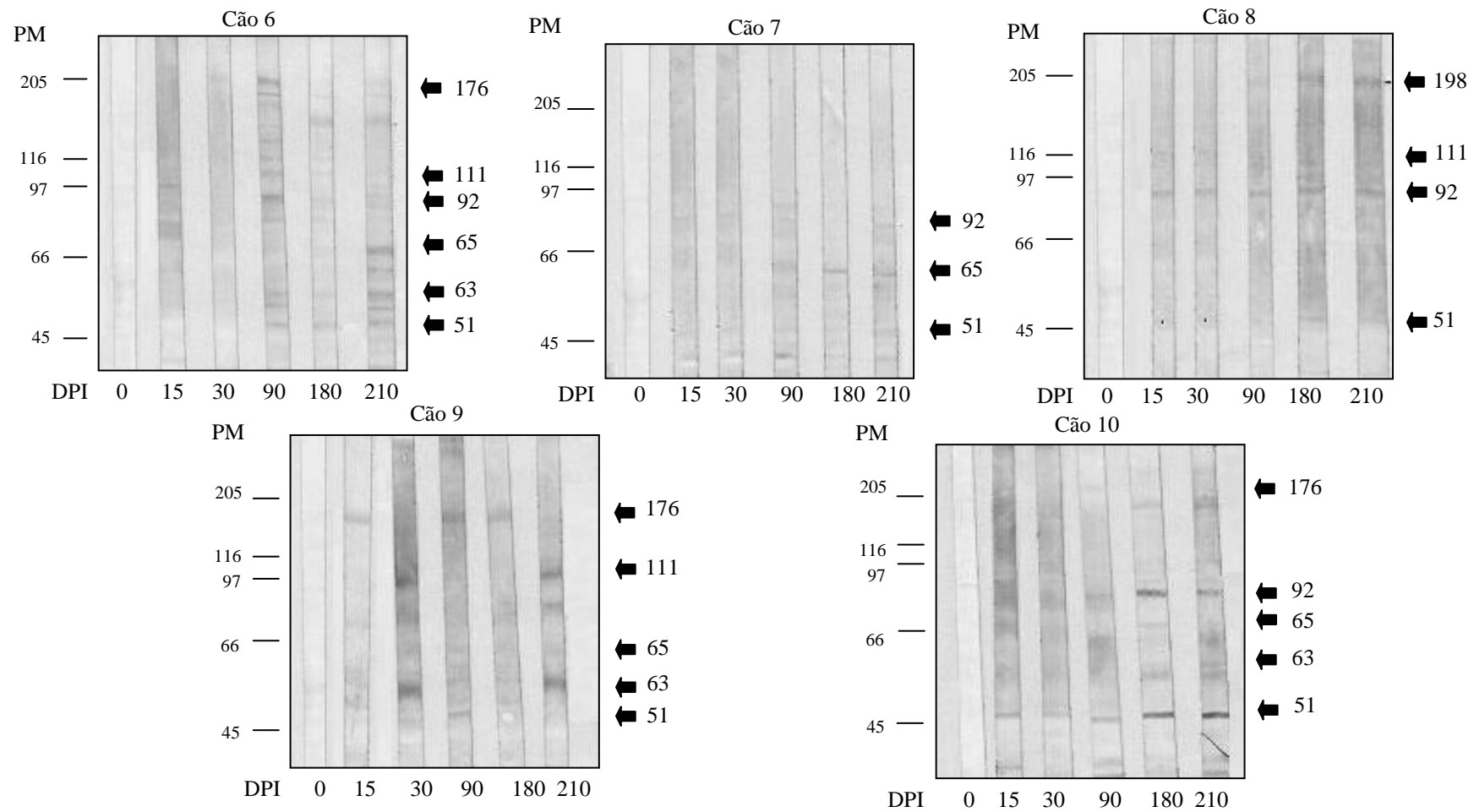


Figura 10 – Continuação - Identificação das proteínas de parasitos adultos de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes fases da infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

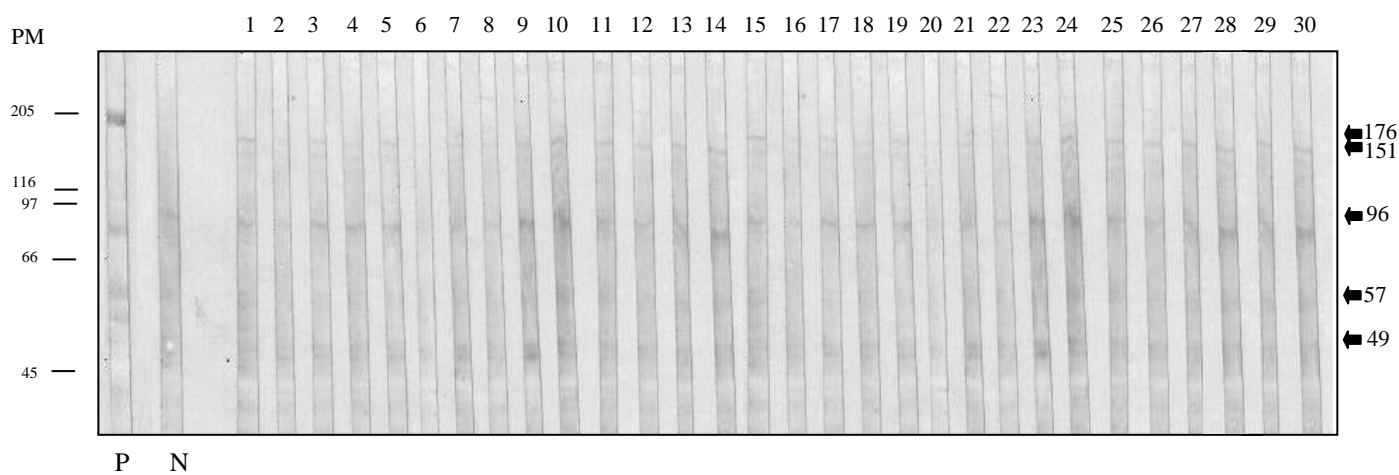


Figura 11 - Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgA presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* .

P= Controle positivo

N= Controle negativo

PM= Padrão de peso molecular

5.3.4 – Identificação de proteínas de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE

Foram reconhecidas nove proteínas de L1 com peso molecular aproximado de 18 kDa a 118 kDa (Tabela 8). Proteínas de 57 kDa, 63 kDa e 65 kDa foram reconhecidas com maior frequência durante todo o período experimental (Fig. 12).

Todos os cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* tinham anticorpos IgE que reconheceram antígenos de L1 de *A. vasorum* de peso molecular aproximado de 28 kDa, 31 kDa, 45 kDa, 65 kDa, 67 kDa, e 70 kDa (Fig. 13).

Anticorpos IgE de cães infectados com *A. vasorum* reconheceram 11 proteínas principais de parasito adulto (Tabela 9). Proteínas de peso molecular aproximado de 33 kDa, 51 kDa, 63 kDa, 65 kDa, 96 kDa, 104 kDa, 111 kDa, 128 kDa e 141 kDa foram reconhecidas com uma maior frequência durante todo o período experimental (Fig. 14). Entretanto, estas proteínas também foram reconhecidas por anticorpos IgE presentes nos soros de cães antes da infecção.

IgE de cães naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e negativos para *A. vasorum* reagiram com todas proteínas de parasitos adultos de *A. vasorum* (Fig. 15).

Tabela 7 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos do isotipo IgE presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno bruto solúvel de larva de primeiro estágio (L1).

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
18	00	02	02	01	01	00
39	00	05	03	02	00	00
45	00	07	04	05	02	05
51	00	02	02	02	02	02
57	06	08	08	09	07	08
63	08	10	10	10	09	09
65	08	09	09	10	07	07
70	01	04	03	03	02	03
118	00	07	07	07	03	03

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

n- Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*

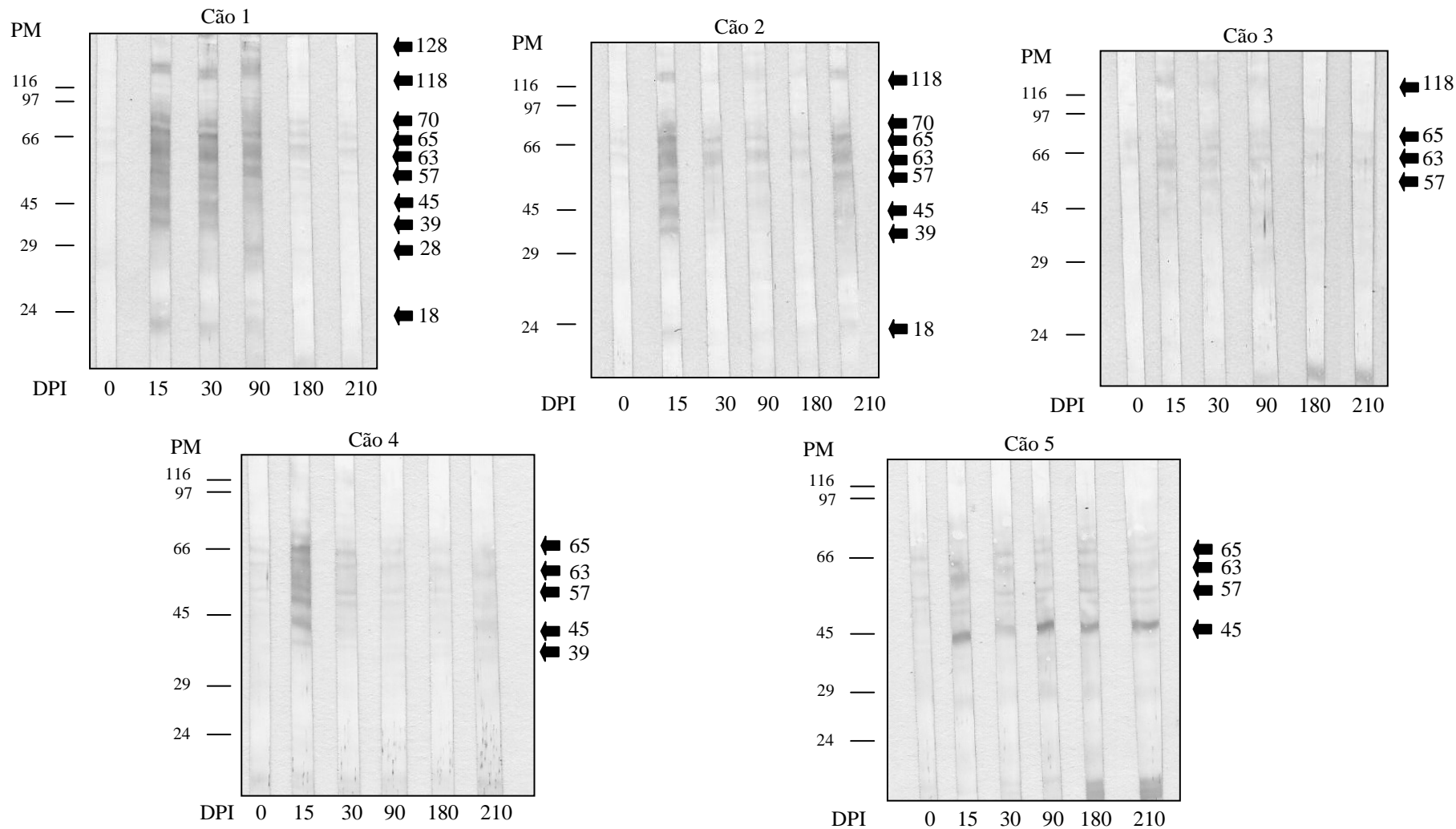


Figura 12 – Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

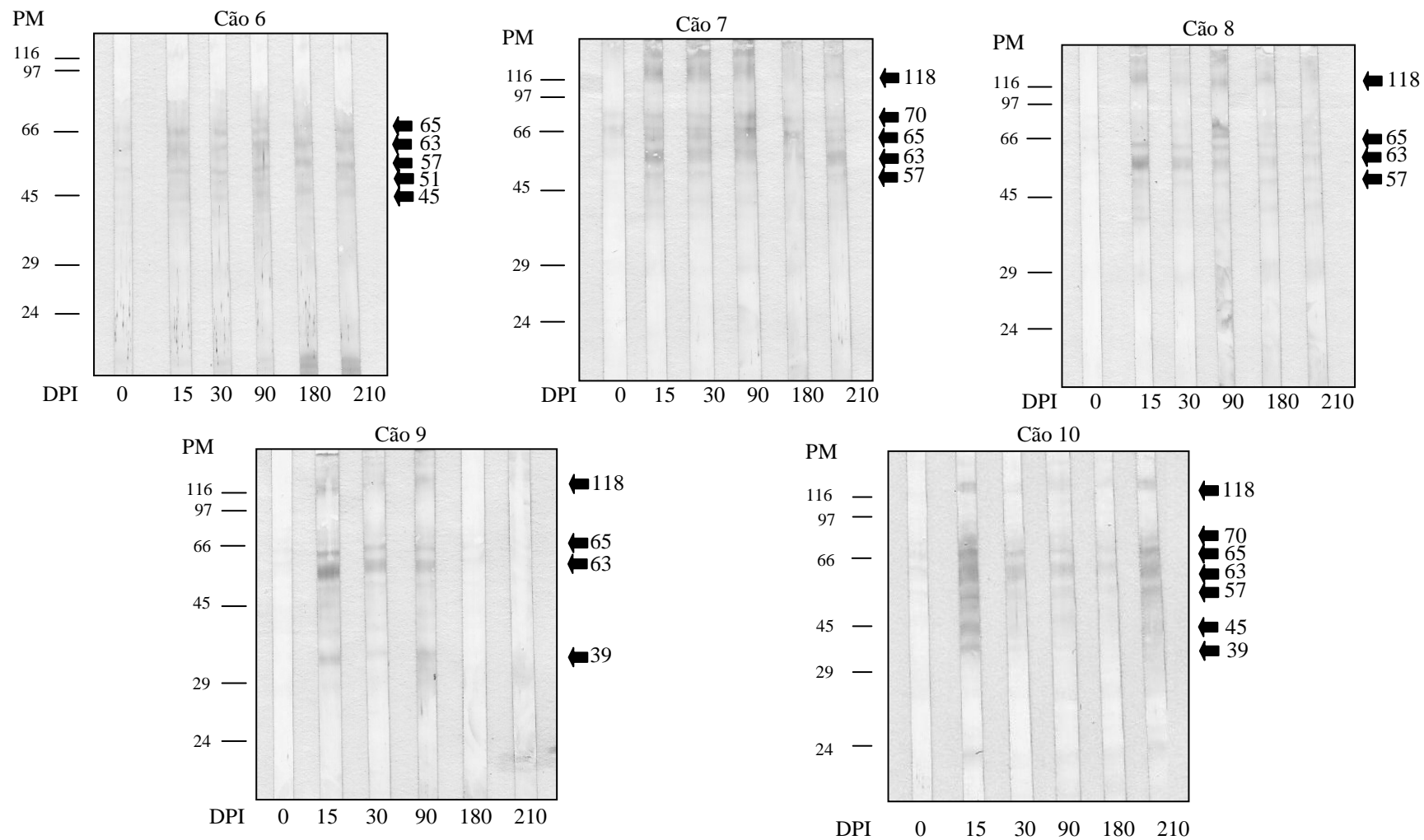


Figura 12 – Continuação - Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção.

DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

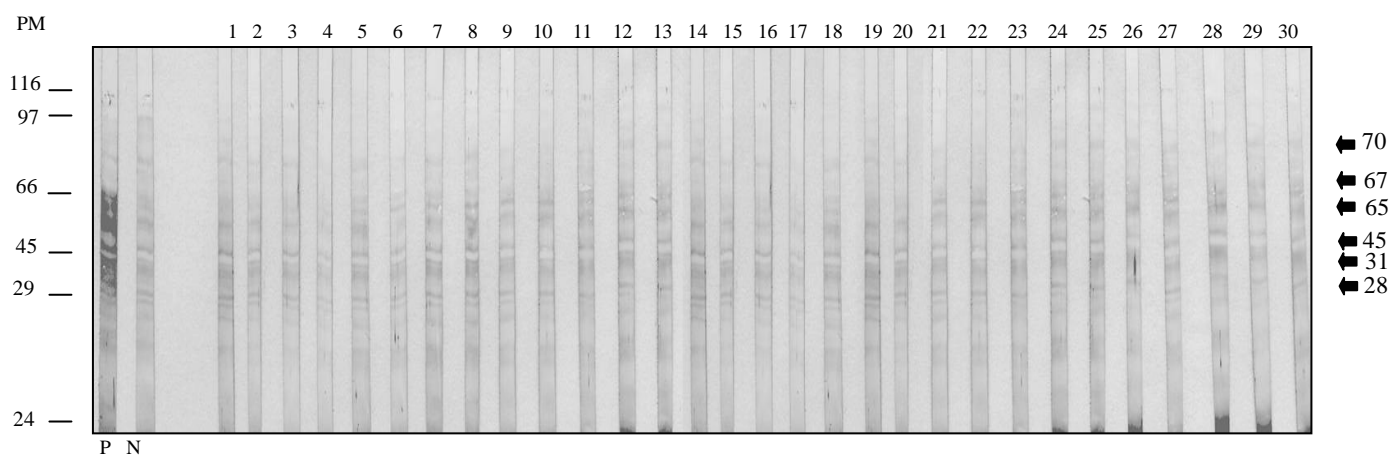


Figura 13 - Identificação das proteínas de larvas de primeiro estágio (L1) de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*.

P= Controle positivo

N= Controle negativo

PM= Padrão de peso molecular

Tabela 8 - Frequência absoluta da reatividade no “Immunoblotting” de anticorpos IgE presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção utilizando antígeno de parasito adulto.

Proteínas (kDa)	0 DPI (n=10)	15 DPI (n=10)	30 DPI (n=10)	90 DPI (n=10)	180 DPI (n=10)	210 DPI (n=10)
28	04	06	05	07	09	09
33	10	09	10	10	10	10
45	05	07	08	07	06	06
51	10	09	10	10	10	10
63	06	10	10	10	10	10
65	06	10	10	10	10	10
96	07	10	10	10	10	10
104	07	08	08	08	08	08
111	07	08	08	08	08	07
128	04	09	09	09	09	09
141	04	10	10	10	10	10

kDa- Peso Molecular em Kilodaltons

DPI - Dias pós - infecção

n- Número de cães infectados experimentalmente por *Angiostrongylus vasorum*.

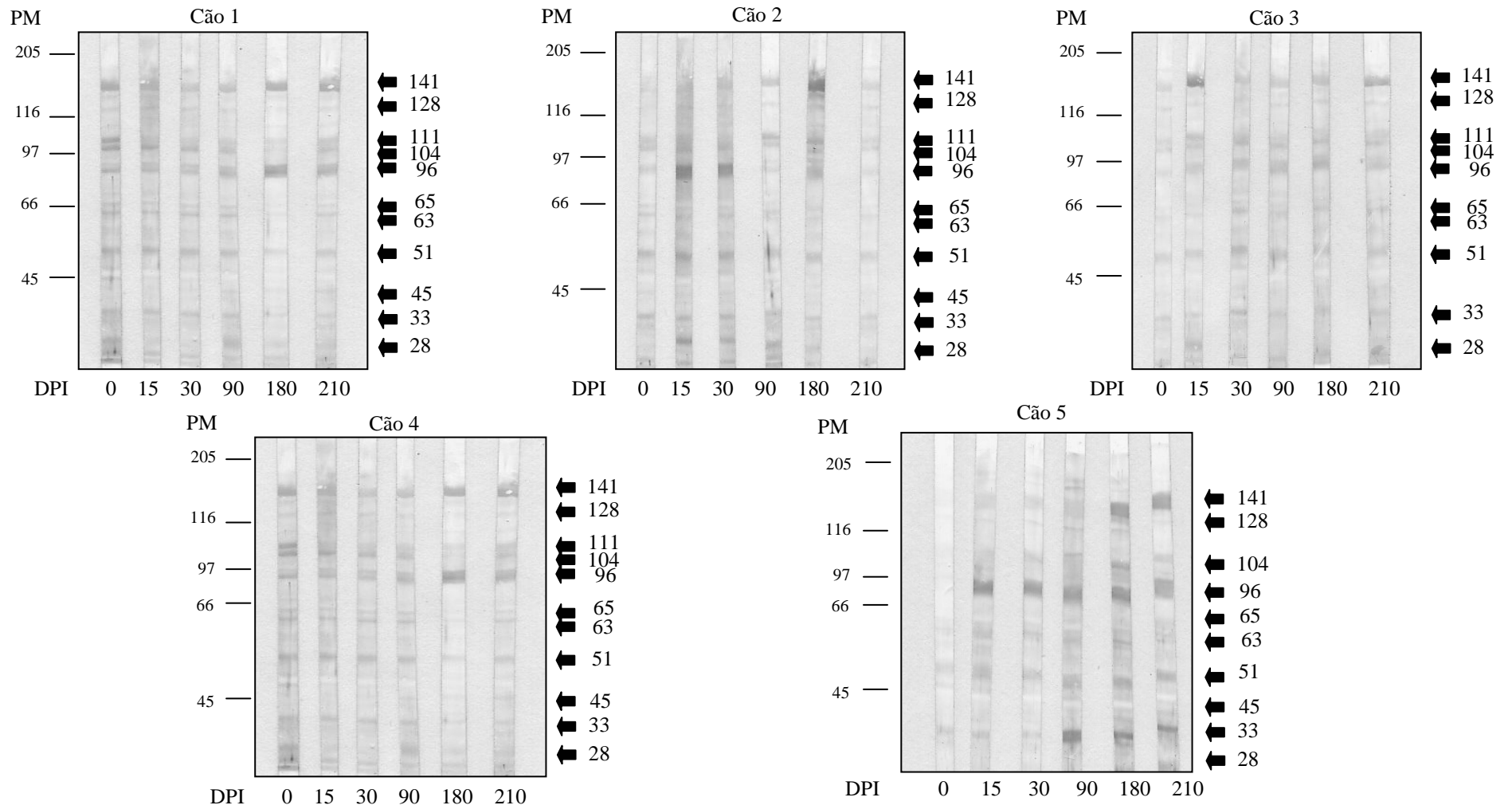


Figura 14 – Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

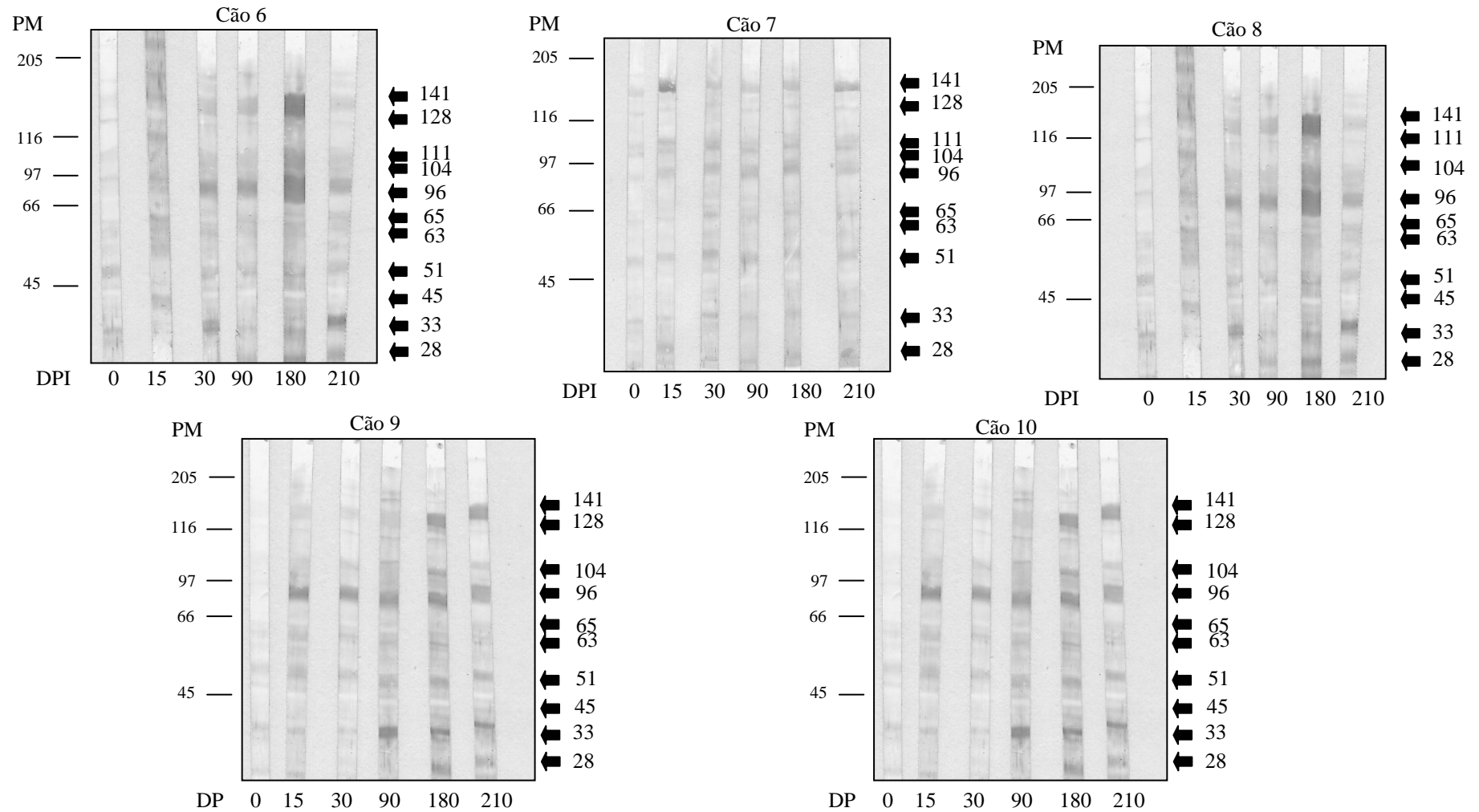


Figura 14 – Continuação - Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos do isotipo IgE presentes nos soros de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção. DPI= Dias após infecção PM= Padrão de peso molecular

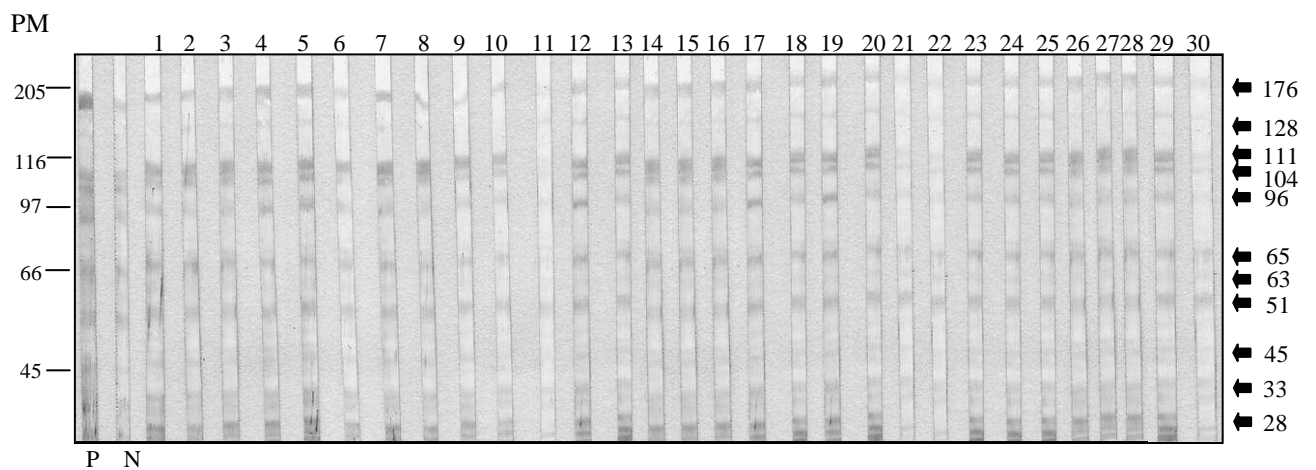


Figura 15 - Identificação das proteínas de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* reconhecidas por anticorpos IgE presentes nos soros de cães naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* .

P= Controle positivo

N= Controle negativo

PM= Padrão de peso molecular

5.4 – Purificações dos Anticorpos Policlonais Anti-Angiostrongylus vasorum

Os anticorpos policlonais anti-*A. vasorum* purificados à partir de soro de cães experimentalmente infectados utilizando uma coluna de Sepharose 4B-CNBr foi ligada, na primeira etapa, por antígenos de parasito adulto de *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e na segunda etapa por antígenos de parasito adulto de *A. vasorum*. Os PcAbs anti-*A. vasorum* presentes em soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* purificados na segunda etapa, foram coletados no primeiro pico e segundo pico onde obtiveram valores em absorbância superiores a 0,05 (frações de 1, 2 e 4) (Gráfico 1).

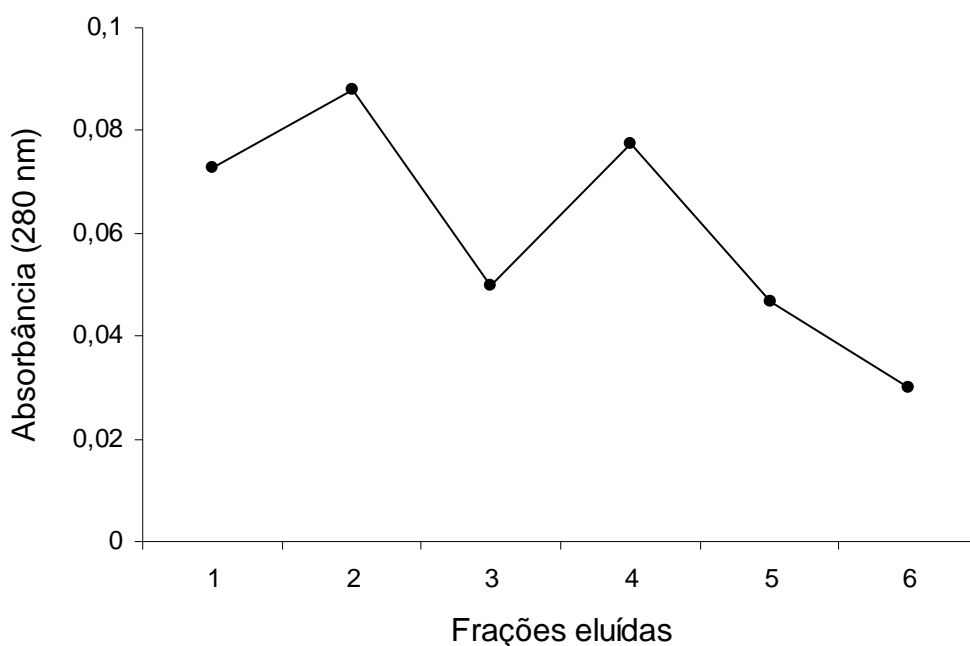


Gráfico 1 – Os anticorpos policlonais anti-*Angiostrongylus vasorum* purificados a partir de soro de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* por cromatografia de afinidade usando Sepharose 4B-CNBr ligada a antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*.

5.5 - Avaliação da Especificidade dos Anticorpos Policlonais Anti-*Angiostrongylus vasorum* Purificados pela Cromatografia de Imunoafinidade

O gráfico 2 mostra a avaliação da especificidade dos PcAbs anti-*A. vasorum* pelo método de ELISA indireto após diferentes passagens pela coluna de imunoafinidade ligada a antígenos de *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*. Observa-se que à medida que os PcAbs foram passados através da coluna de imunoafinidade a inespecificidade desses anticorpos foi diminuindo. Após a terceira passagem através da coluna não foi observada reatividade cruzada com antígeno de *T. canis* (AgPATc) utilizando os PcAbs anti- *A. vasorum* na diluição de 1/203 (Gráfico 2 C). Na segunda etapa de purificação, pode-se observar a ausência da reatividade cruzada com os antígenos de *T. canis* (AgPATc), *A. caninum* (AgPAAc) e *D. caninum* (AgPADc) utilizando os PcAbs anti- *A. vasorum* na diluição de 1/203 (Gráfico 3).

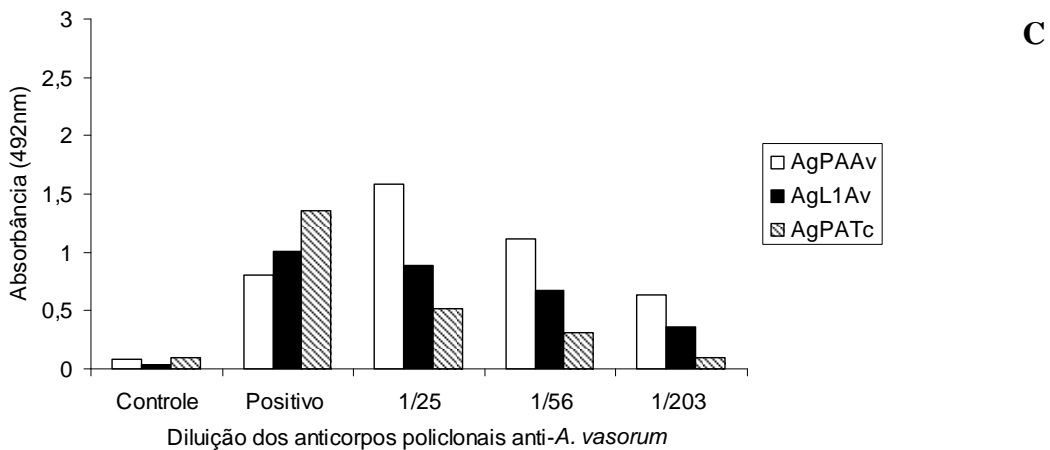
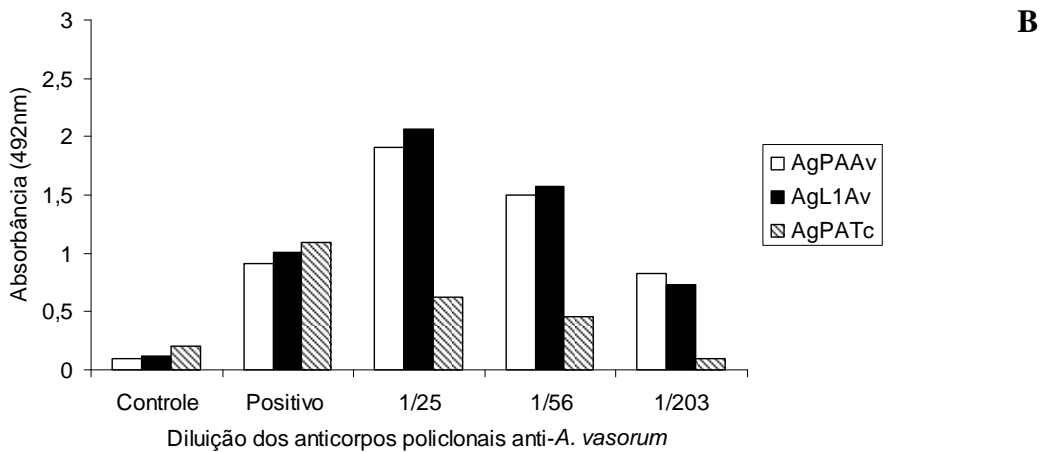
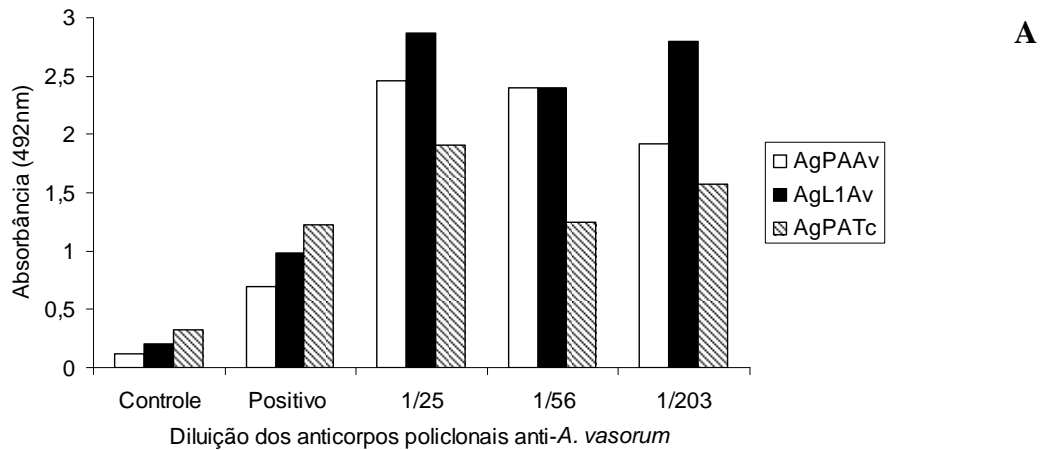


Gráfico 2 - Especificidade dos anticorpos policlonais anti-*Angiostrongylus vasorum* purificados por cromatografia de afinidade utilizando Sepharose 4B-CNBr ligada aos antígenos de *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* por ELISA indireto. **A**, **B** e **C** - anticorpos policlonais passados 1, 2 e 3 vezes, respectivamente pela coluna de Imunoafinidade. A placa de ELISA foi sensibilizada com antígeno de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* (AgPAAv), antígeno de larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* (AgL1Av), antígeno de parasito adulto de *Toxocara canis* (AgPATc). Valores das absorbâncias dos anticorpos policlonais purificados e não purificados presentes no “pool” de soros de 10 cães experimentalmente infectados e “pool” de soros de 10 cães não infectados.

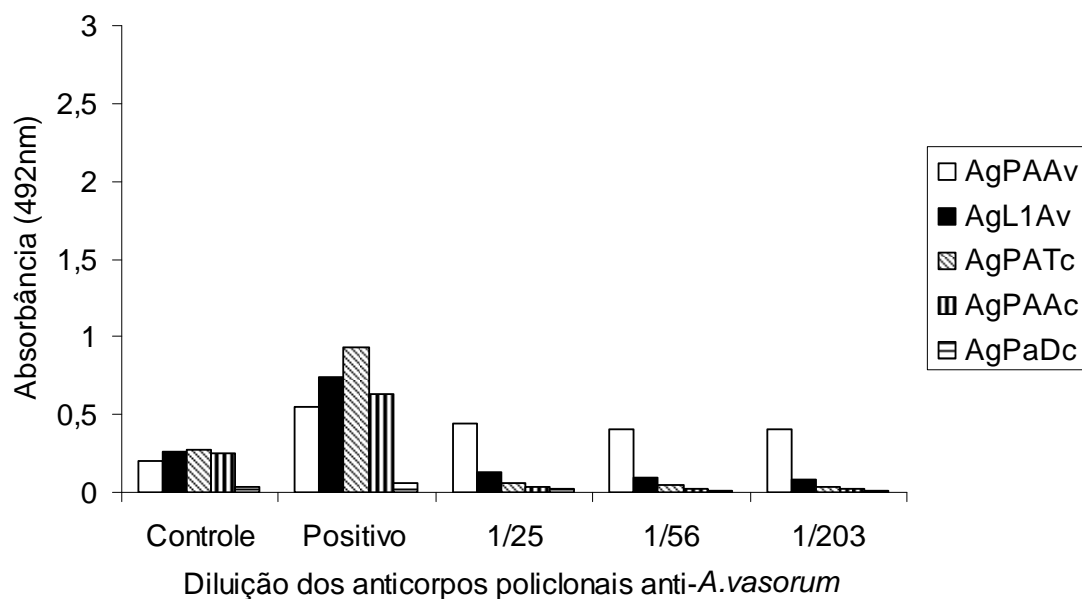


Gráfico 3 - Especificidade dos anticorpos policlonais anti-*Angiostrongylus vasorum* purificados por cromatografia de afinidade utilizando Sepharose 4B-CNBr ligada ao antígeno de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* por ELISA indireto. A placa de ELISA foi sensibilizada com antígeno de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* (AgPAAv), antígeno de larva de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* (AgL1Av), antígeno de parasito adulto de *Toxocara canis* (AgPATc), antígeno de parasito adulto de *Ancylostoma caninum* (AgPAAc) e antígeno de parasito adulto de *Dipylidium caninum* (AgPADc). Valores das absorbâncias dos anticorpos policlonais purificados e não purificados presentes no “pool” de soros de 10 cães experimentalmente infectados e “pool” de soros de 10 cães não infectados.

5.6 – Purificação da Proteína Específica de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum*

Após a purificação dos PcAbs anti-*A. vasorum*, estes foram utilizados na purificação das proteínas específicas de parasito adulto de *A. vasorum* pela cromatografia de imunoafinidade na coluna de proteína A como resina ligadora de IgG. A figura 16 apresenta a análise eletroforética da proteína imunogênica purificada de *A. vasorum* onde se pode observar uma banda predominante de peso molecular de aproximadamente 51 kDa. Foram utilizados na purificação 30 mg de proteína total de parasito adulto de *A. vasorum*, obtendo-se após a purificação 0,22mg da proteína de 51 kDa.

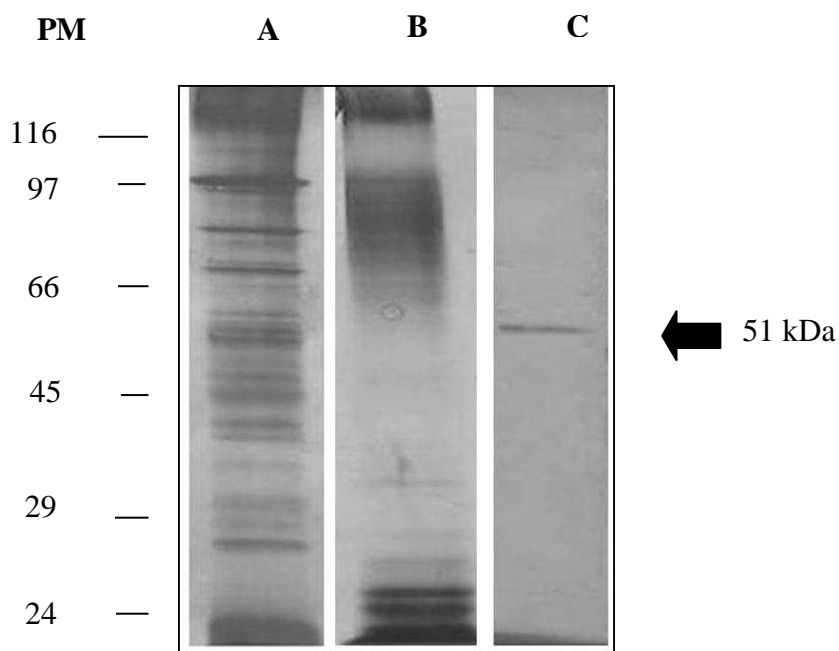


Figura 16 - SDS-PAGE a 10% com redução, do antígeno de parasito adulto (A), do antígeno de larva de primeiro estágio (B) na concentração de 10µg, revelando a proteína purificada de 51 kDa (C) corada por Nitrato de Prata.
PM – Padrão de peso molecular.

5.7 - Avaliação da Cinética de Produção de Anticorpos Policlonais IgG Anti - 51 kDa de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum*

Após a purificação e análise eletroforética da proteína de 51kDa, a avaliação da cinética de produção de PcAbs IgG anti-proteína de 51kDa foi realizada através do método de ELISA indireto. As placas de poliestireno foram sensibilizadas com 5µg/mL da proteína de 51 kDa por um período de 3 horas a 37°C utilizando Caseína a 2% como bloqueio, soros de cães negativos e positivos para *A. vasorum* na diluição de 1:1000 e o conjugado PcAbs anti-IgG de cão na diluição de 1:5000 em PBS 0,1M pH 7,4 Tween 20 0,05% acrescida de Caseína a 0,2%.

A cinética do PcAbs IgG presente no soro de animais infectados e animais controle que reconhecem especificamente a proteína de 51kDa e antígeno total de parasito adulto de *A. vasorum* foram expressas em valores médios de absorvância.

Foram observadas diferenças significativas nos valores médios da absorvância entre os animais do grupo controle e animais infectados ($F=16,442$, $p<0,05$).

Após a infecção foi observado um aumento significativo nos níveis de PcAbs IgG específicos anti-51kDa no soro de animais infectados. Em todos os dias após a infecção utilizados nos experimentos, os valores médios de absorvância foram significativamente superiores aos dos animais controle ($p<0,05$) (Gráfico 4 A). Aos 30 dias após a infecção foi observada uma queda não significativa nos níveis de anticorpos e aos 90 dias após a infecção uma elevação não significativa nos valores médios de absorvância.

Com relação aos níveis de PcAbs IgG específicos para antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum*, os valores médios de absorvância foram significativamente superiores aos dos animais controle ($p<0,05$). Foi observada uma elevação significativa nos valores médios de absorvância aos 90 dias após a infecção ($p<0,05$) (Gráfico 4 B).

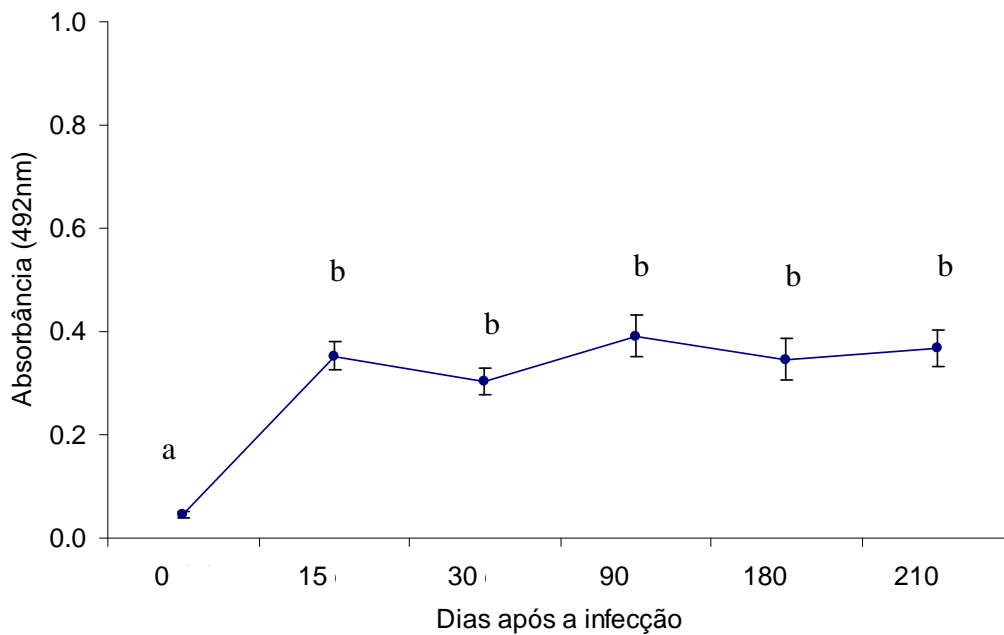
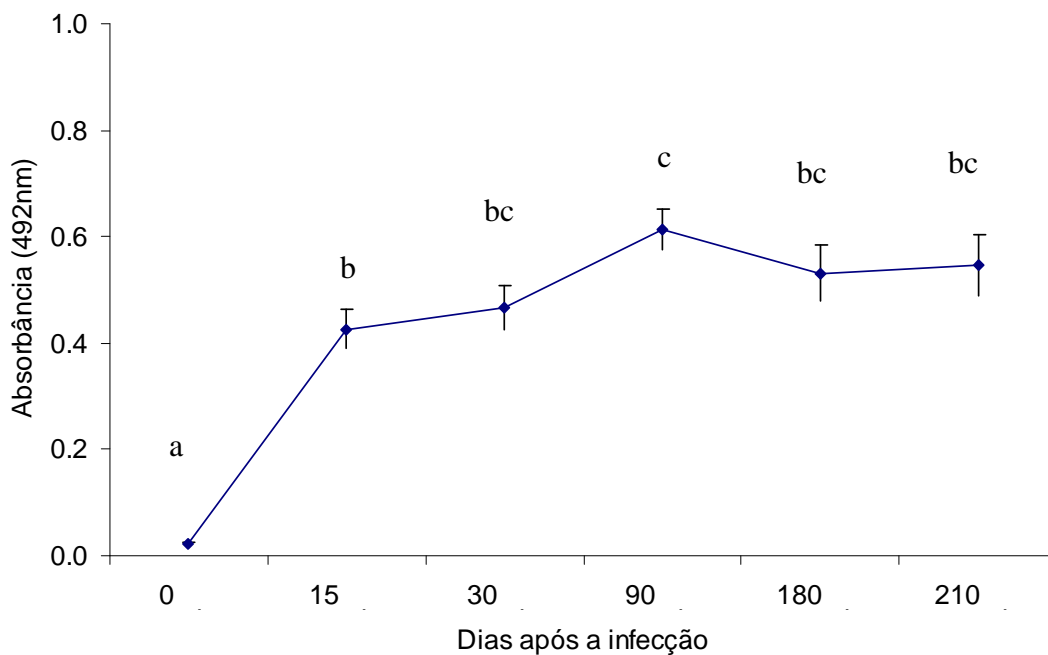
A**B**

Gráfico 4 - Cinética de produção de anticorpos IgG que reagem com antígeno de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*. **A**. Antígeno purificado de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum* de peso molecular aproximado de 51kDa purificado por cromatografia de imunoafinidade na coluna de Proteína A ligada ao anticorpo policlonal IgG específico anti-*A. vasorum*. **B** - Antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*. Valores médios das absorbâncias dos anticorpos policlonais IgG presentes no soro de 20 cães experimentalmente infectados. As barras verticais correspondem ao erro padrão para cada ponto. Letras diferentes representam diferença estatística a nível de 5% de confiança.

5.8 - Avaliação da Especificidade da Proteína Purificada de 51 kDa de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum*

Para a avaliação da especificidade da proteína de 51 kDa foram testados soros de animais infectados, soros de animais negativos e soros de animais naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* na diluição de 1:1000 em PBS 0,1M pH 7,4 Tween 20 0,05% acrescida de Caseína a 0,2%. Como demonstrado no Gráfico 5 B, todos os soros de animais infectados por *A. vasorum* apresentaram reativos no ELISA indireto com a proteína purificada de 51kDa ao contrário do observado para os soros de animais controle e animais naturalmente infectados por outros helmintos gastrointestinais que não apresentaram reatividade com a proteína de 51 kDa, caracterizando ausência de reação cruzada (Gráfico 5 A).

O limite de detecção que permitiu separar animais positivos e animais negativos para a infecção por *A. vasorum* no ELISA indireto padronizado para pesquisa de IgG específica anti-antígeno bruto foi de 0,067. Dos 60 soros de animais naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*, 21 soros (33%) foram reativos caracterizando a presença de reação cruzada (Gráfico 5A).

A especificidade do ELISA para pesquisa de IgG utilizando antígeno solúvel bruto de parasito adulto de *A.vasorum* foi de 79% e a sensibilidade foi de 100%.

Com relação à proteína purificada de 51 kDa, o limite de detecção que permitiu separar animais positivos e animais negativos para a infecção por *A. vasorum* no ELISA indireto padronizado para pesquisa de IgG específica para a proteína de 51 kDa foi de 0,148.

Quatro amostras de soros positivos para *A. vasorum* e três amostras de soros de cães positivos para outros helmintos gastrointestinais apresentaram leituras próximas ao limite máximo (“boderline”), que são amostras indeterminadas apresentando valores superiores ou inferiores a 10% do cut-off (0,148), dentro do qual não se pode ter certeza do resultado.

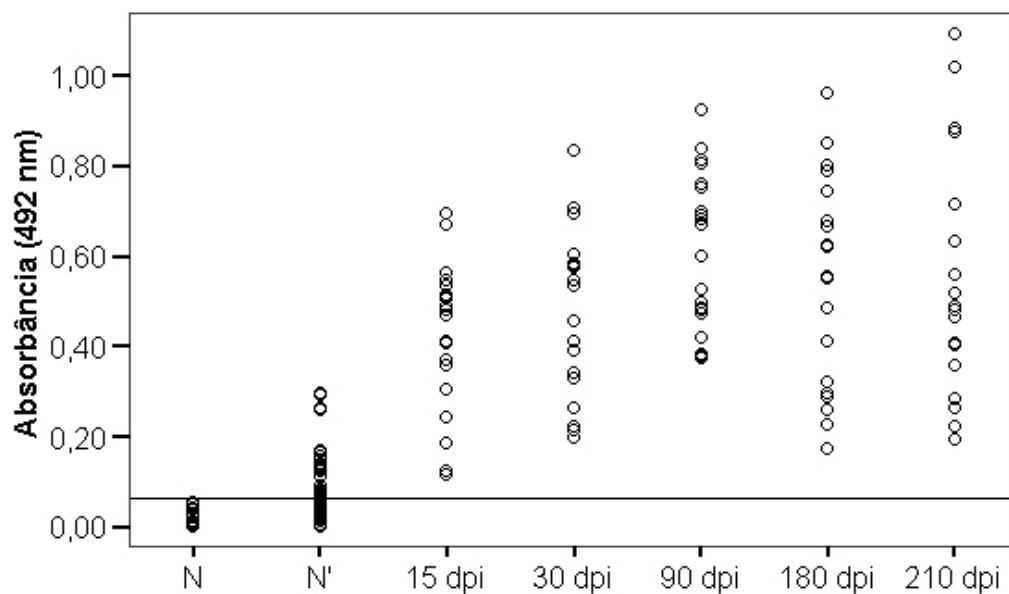
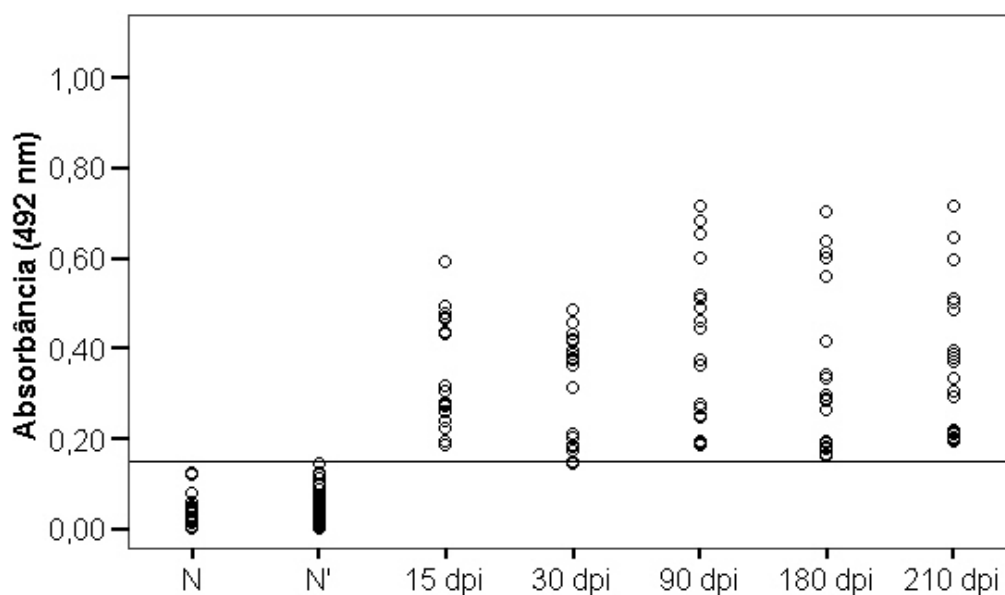
A**B**

Gráfico 5 - Distribuição dos valores em absorbância para detecção de anticorpos policlonais IgG anti-antígeno bruto (A) e anti-proteína de 51 kDa purificada (B) de parasito adulto de *Angiostrongylus vasorum*. N - soro de animais livres da infecção por *Angiostrongylus vasorum* e outras helmintoses, N' - soro de animais naturalmente infectados por *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum* e livres de infecção por *Angiostrongylus vasorum*, além de soros de animais experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* em diferentes dias após a infecção.

(—): Cut-off (média das absorbâncias de dez animais controle negativo somada a três vezes o valor do desvio padrão das amostras).

6-DISCUSSÃO

6- DISCUSSÃO

Os poucos trabalhos encontrados na literatura referentes as técnicas sorológicas utilizadas no imunodiagnóstico da angiostrongilose canina não dão subsídios para serem considerados testes confiáveis, uma vez que detectam tanto anticorpos específicos contra antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum* como para antígenos de outros helmintos. A necessidade crescente de antígenos purificados para a aplicação em ensaios imunológicos, requer a purificação de antígenos que permitam a separação de uma proteína alvo de outras proteínas presentes no sistema. Desta forma, a identificação de antígenos fracionados reconhecidos por diferentes classes de anticorpos é importante para o desenvolvimento de testes sorológicos com o objetivo de estabelecer melhores índices de especificidade sem perder a sensibilidade no diagnóstico da angiostrongilose canina utilizando proteínas purificadas de *A. vasorum*.

6.1- Identificação de Proteínas de Larvas de Primeiro Estádio (L1) e de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum* Reconhecidas por Anticorpos de Diferentes Isotipos

Neste estudo, vários antígenos de L1 e parasito adulto, com peso molecular semelhantes foram detectados por diferentes classes de anticorpos presentes no soro de cães experimentalmente infectados. A resposta do anticorpo IgG foi direcionada principalmente aos antígenos de L1 de 28, 39, 51, 57, 63, 65 e 118 kDa e aos antígenos de parasito adulto de 51, 63, 92 e 209 kDa. Trabalhos realizados por CURY *et al.*, (2002), utilizando antígeno de parasito adulto de *A. vasorum*, detectaram antígenos de 28, 102 e 115 kDa que foram reconhecidos por anticorpos IgG presentes nos soros de cães experimentalmente infectados indicando-as como as principais proteínas imunogênicas nas infecções por *A. vasorum*.

A IgG é a principal imunoglobulina do sangue, respondendo por cerca de 80 a 88% do total de imunoglobulinas em cães e por essa razão desempenha um papel principal nos mecanismos de defesa dependente de anticorpos (PASTORET, *et al.*,

1998). As infecções por *A. vasorum* leva a um aumento significativo nos níveis séricos de anticorpos IgG específicos para antígenos de L1 e de parasito adulto, apresentando papel fundamental na opsonização de partículas estranhas assim como na ativação do complemento (BARÇANTE, 2004). Neste estudo, a elevação nos níveis de IgG pode ser observada a partir do 15º dia após a infecção, quando foram reconhecidas um grande numero de proteínas de L1 e de parasito adulto.

A resposta do anticorpo IgM, observada neste estudo foi direcionada principalmente aos antígenos de L1 de 63, 65 e 70 kDa e aos antígenos de parasito adulto de 51, 57 e 63 kDa. A imunoglobulina M é característica de uma resposta imune primária participando dos principais mecanismos de defesa na fase inicial da infecção, ligando-se a antígenos de *A. vasorum* e ativando a cascata do complemento com a lise mediada pelo complemento (CARUSO & PRESTOWOOD, 1988; PASTORET *et al.*, 1998).

Porém, ao contrário do observado para o anticorpo IgG, com o avanço da infecção, observou-se uma diminuição no número de componentes de L1 que são reconhecidos pelo anticorpo do isotipo IgM. Essa diminuição também parece estar relacionada com a disponibilidade dos antígenos larvais na corrente sanguínea. De acordo com o ciclo de vida de *A. vasorum*, a partir do 30º dia após a infecção corresponde a maturação sexual, reprodução dos parasitos adultos e postura dos ovos não embrionados nas artérias pulmonares e a eclosão de L1 que atravessam ativamente para os alvéolos pulmonares. Devido ao seu grande tamanho, uma vez que possui uma estrutura pentamérica, os anticorpos IgM são basicamente confinados ao sistema vascular e são em decorrência disso, de menor importância nos fluidos teciduais e secreções do organismo. Além disso, a diminuição na intensidade de reconhecimento de antígenos de L1 e de parasito adulto observada neste estudo pode ser devido ao fato de este isotipo ser de baixa afinidade. Segundo BARÇANTE (2004), a verificação de animais infectados por *A. vasorum* com resultados muito baixos para a pesquisa do anticorpo IgM na sorologia, associada ao fato de que este isotipo ser de baixa afinidade, indicam que a ocorrência de resultados falsos negativos pode ser um evento comum na pesquisa deste isotipo.

Com relação ao anticorpo IgA, este por estar disponível em baixos níveis no soro e mais elevados nas superfícies mucosas (PASTORET *et al.*, 1998), demonstrou

uma menor afinidade aos antígenos de L1 e de parasito adulto, direcionando a resposta a um número reduzido de antígenos, onde as proteínas de L1 de 63 e 65 kDa e de parasito adulto de 51 e 63 kDa foram mais frequentemente reconhecidas.

A resposta do anticorpo IgE tem sido associada a infecções helmínticas e doenças alérgicas. Apesar de representar uma parte mínima das imunoglobulinas presentes no soro de mamíferos, durante as infecções helmínticas, o nível de IgE no soro pode aumentar consideravelmente (NEGRÃO-CORRÊA, 2001). Na angiostrongilose canina, os níveis de anticorpos IgE específicos para antígenos de L1 e de parasito adulto eleva-se principalmente na fase aguda da infecção (BARÇANTE, 2004). A resposta de IgE no soro de animais infectados por *A. vasorum*, devido a presença de parasito adulto de *A. vasorum* com seus produtos de excreção e secreção eliminados na corrente sanguínea faz com que mantenha níveis constante e elevados no sangue (BARÇANTE, 2004), desta forma aumenta a intensidade de reconhecimento de antígenos de parasito adulto observados neste estudo. Por outro lado, o reconhecimento de antígenos de L1 pelo Immunoblotting para o anticorpo IgE até o 30º dia após a infecção corroboram com os resultados obtidos por BARÇANTE (2004), onde, com a passagem constante de L1 dos vasos para o sistema respiratório faz com que ocorra um influxo de imunoglobulinas do sangue para os pulmões com o objetivo de defesa contra essas larvas.

A identificação de antígenos comuns a outros helmintos é um dos principais objetivos nos estudos de imunodiagnóstico. Desta forma, a angiostrongilose canina pode está associada a certas infecções helmínticas comuns encontradas em cães como *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* e *Dipylidium caninum*. Todos esses parasitos podem levar a uma sintomatologia bastante polimórfica e no caso da angiostrongilose, as alterações não são específicas e podem ser confundidas com outras patologias. Desta forma, este estudo demonstrou que antígenos de parasito adulto são bastante heterogêneos, contendo componentes capazes de induzir uma resposta imune com uma especificidade variada em cães infectados por *A. vasorum*.

A técnica de Immunoblotting demonstrou que parasitos adultos de *A. vasorum* possuem antígenos comuns a outros parasitos, apresentando reatividade cruzada com anticorpos presentes em soros de cães infectados por outros helmintos (*T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*). Resultados semelhantes foram observados quanto ao antígeno

de *A. costaricensis* (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 1997 & GEIGER *et al.*, 1999) e de *A. cantonensis*, demonstrando a presença de determinantes antigênicos em comum a outras espécies de parasitos, particularmente com helmintos (KUM & KO, 1985; 1986; FUJII, 1987; 1988; NUAMTANONG, 1996; EAMSOBHANA *et al.*, 2001).

Ao contrário do sugerido por BARÇANTE (2004) no teste de ELISA indireto, os resultados deste estudo obtidos pela técnica de Immunoblotting mostraram uma baixa reatividade cruzada contra antígeno bruto solúvel de parasito adulto para os anticorpos IgG, IgA e IgM presentes em soros de cães infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* e uma forte reatividade cruzada contra proteínas de L1 e de parasito adulto para o anticorpo IgE.

O anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* demonstrou uma resposta direcionada a uma grande quantidade de proteínas de parasito adulto durante todo o período de observação, ao contrário do observado para os anticorpos IgM e IgA. Adicionalmente, além da baixa reatividade cruzada demonstrada por este isotipo, as proteínas de 51, 63 e 209 KDa não demonstram reatividade cruzada quando testadas para os anticorpos presentes nos soros de cães naturalmente infectados por outros helmintos (*T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*). Desta forma, sugere-se que estas proteínas presentes no antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum* assumam um papel importante na indução da resposta imune em cães. Todavia, CURY *et al.*, (2002), indicaram as proteínas de peso aproximado de 28, 102 e 115 KDa como as principais proteínas nas infecções por *A. vasorum*. Diferente da metodologia utilizada neste estudo, estes autores usaram antígenos extraídos apenas de parasitos fêmeas de *A. vasorum* que foram separadas em gel de poliacrilamida de 10%. Adicionalmente, os autores não testaram soros de cães infectados por outros helmintos para a verificação da presença de determinantes antigênicos comuns a outros helmintos.

Os métodos de diagnóstico sorológico têm sido utilizados com grande sucesso para revelar antígenos e anticorpos específicos de parasitos do gênero *Angiostrongylus*. A utilização de antígenos de vários estádios do parasito tem sido objeto de estudo por vários autores. O perfil protéico de L1 e L3 de *A. cantonensis* foi analisado e mostrou-se ser complexo consistindo de mais de 20 polipeptídeos diferentes de peso molecular que variam de 8 a 130 kDa, indicando a importância dos antígenos larvais para o diagnóstico de *A. cantonensis*, particularmente em infecções recentes (CROSS & CHI,

1982; DHARMKRONG-AT & SIRISINHA, 1983; CHEN, 1986; YEN & CHEN, 1991; CHYE *et al.*, 2000). Os antígenos de *A. vasorum* possuem uma variabilidade na expressão das moléculas protéicas nos diferentes estádios deste parasito. Esta variabilidade possivelmente favorece o mecanismo de escape do estágio larvar e dos parasitos adultos das defesas do sistema imunológico do hospedeiro permitindo a migração e implantação da doença. Adicionalmente, tanto o antígeno larval como antígeno de parasito adulto de *A. vasorum* são adequados para serem utilizados nos testes de diagnóstico por estimular a produção de anticorpos contra este parasito em qualquer fase da infecção.

6.2- Purificação da Proteína Purificada de 51 kDa de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum*

A história do desenvolvimento de imunodiagnóstico em infecções helmínticas inclui esforços permanentes de purificação e avaliação de antígenos espécie-específicos. Antígenos purificados por cromatografia têm com objetivo de impedir a interferência de antígenos responsáveis pela reatividade cruzada, aumentando a especificidade dos testes diagnósticos comparativamente aos extratos de antígenos bruto dos parasitos.

A reatividade cruzada de soros imune anti-*A. vasorum* observada no Immunoblotting e evidenciada pelo método de ELISA indireto utilizando antígeno de parasito adulto de *A. vasorum*, *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*, parasitos frequentemente encontrados em cães, sugerem a existência de antígenos comuns a estas espécies. Para a otimização do teste de ELISA indireto para a detecção de anticorpos IgG anti-*A. vasorum* tornou-se necessário, primeiramente, a purificação de anticorpos específicos anti-*A. vasorum* e finalmente a obtenção de antígenos que lhes correspondem. Neste estudo, anticorpos policlonais específicos anti-*A. vasorum* foram obtidos de soro de cães experimentalmente infectados através de passagens sucessivas na coluna de Sepharose 4B ativada com CNBr ligada à antígenos de diferentes espécies de helmintos gastrointestinais (*T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum*), onde pode-se observar pelo ELISA menores índices de reatividade cruzada com os antígenos desses parasitos.

Considerando a importância dos testes sorológicos na prática clínica para o diagnóstico da angiostrongilose canina, o presente estudo refere-se ao emprego de proteína purificada de parasito adulto de *A. vasorum* com aplicação na otimização do ELISA indireto.

O antígeno bruto solúvel é uma mistura complexa e direcionar a purificação de seus componentes é importante para a aplicação em diagnóstico. A infecção por *A. vasorum*, bem como por *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, induz a formação de anticorpos que podem reagir com antígenos de outros parasitos (CURY *et al.*, 1996; NUAMTANONG, 1996; EAMSOBHANA *et al.*, 2001). A purificação de antígenos específicos de espécies de parasito do gênero *Angiostrongylus*, tem sido usada com a finalidade de se obter maiores índices de sensibilidade e especificidade nos testes de diagnóstico e várias metodologias tem sido propostas como cromatografia de exclusão em gel, troca iônica, cromatografia de imunoafinidade e eletroeluição em gel de SDS-PAGE (KAMIYA *et al.*, 1973; SUZUKI *et al.*, 1975; KUM & KO, 1985, 1986; YEN & CHEN, 1991; EAMSOBHANA *et al.*, 2001).

A purificação eficiente de antígenos específicos de *A. vasorum* foi conseguida por cromatografia de afinidade. Os absorventes comumente utilizados usam como ligantes proteínas da superfície de bactérias que interagem com a fração Fc das IgG, designadamente as Proteínas A e G, isoladas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* dos grupos C e G, respectivamente. Devido a maior afinidade da proteína A com a fração Fc ao anticorpo IgG purificado obtidos de soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum*, esta proteína foi utilizada como ligante com a finalidade de se purificar antígenos específicos de *A. vasorum*.

Das quatro proteínas reconhecidas com maior frequência por IgG através do Immunoblotting como sendo possíveis proteínas específicas de parasito adulto de *A. vasorum*, somente a proteína de aproximadamente 51 kDa foi evidenciada na eletroforese de gel de poliacrilamida. Possivelmente, fatores como a desnaturação de proteínas devido as etapas de diálise e liofilização as quais as amostras purificadas foram submetidas ou também devido a baixas concentrações, as proteínas de 63, 92 e 209 kDa do antígeno bruto de parasito adulto não foram visualizadas no gel de eletroforese. A purificação do antígeno de parasito adulto de *A. cantonensis* através da técnica de cromatografia de imunoafinidade revelou 10 proteínas de peso molecular

aproximado de 10 a 42 kDa (KUM & KO, 1986). Porém, somente as proteínas de 29 e 31 kDa foram identificadas como proteínas específicas de *A. cantonensis* sugerindo o uso destes componentes antigênicos nos testes de diagnóstico da angiostrongilose humana (NUAMTANONG, 1996; EAMSOBHANA *et al.*, 2001; INTAPAN *et al.*, 2003). Proteínas de 80 a 210 kDa do parasito adulto de *A. costaricensis* foram indicadas como proteínas imunodominantes, porém, com grande parte da reatividade cruzada dirigida a proteínas de peso molecular superior a 90 kDa (GRAEFF-TEIXEIRA *et al.*, 1997; GEIGER *et al.*, 1999). Por outro lado, estudos realizados por ABRAHAM *et al.*, (2004) mostraram que as proteínas de baixo peso molecular de 20 e 30 kDa purificadas por eletroeluição em gel de SDS-PAGE promovem uma resposta humoral mais específica.

6.3 - Avaliação da Cinética de Produção de Anticorpos Policlonais IgG Anti-Proteína de 51 kDa de Parasito Adulto de *Angiostrongylus vasorum*

A cinética de produção de anticorpos policlonais IgG anti- proteína purificada de 51 kDa e anti-antígeno bruto de *A. vasorum* foi avaliada pelo método de ELISA indireto. Os níveis de IgG sérico dos animais infectados específicos para a proteína purificada de 51 kDa, apresentaram uma elevação a partir do 15º dia após a infecção e se mantiveram elevados durante os 210 dias de observação com níveis superiores aos valores observados para animais não infectados. A queda verificada nos níveis de anticorpos a partir do 30 dias após a infecção não foi significativa, sendo observada uma manutenção nos níveis desta imunoglobulina no sangue dos animais infectados até o término do período de observação. Com relação a IgG anti-antígeno bruto de *A. vasorum*, a maior elevação foi verificada aos 90 dias após a infecção, sendo os valores superiores aos valores obtido dos animais não infectados. A queda verificada aos 180 dias não foi significativa, mantendo-se elevada até o final do período de observação. Os resultados apresentados corroboram os resultados obtidos por COSTA *et al.*, (1996); CURY *et al.*, (1996) e BARÇANTE (2004), onde se pode observar que as infecções por

A. vasorum leva a um aumento significativo nos níveis de anticorpos IgG específicos para antígenos de parasito adulto com tendência a cronicidade.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* se ligam à proteína de 51 kDa confirmando assim a antigenicidade desta proteína. Assim como o antígeno bruto, a proteína de 51 kDa foi reconhecida durante toda a fase da infecção por *A. vasorum* mantendo os níveis do anticorpo IgG sérico elevados e superiores aos animais não infectados.

Quando se fala em diagnóstico, há dois parâmetros importantes: a sensibilidade e a especificidade do método. A sensibilidade determina a capacidade de detecção de todos os pacientes soropositivos, enquanto a especificidade determina que só se detecte os pacientes soropositivos para a enfermidade investigada. Assim, o método ideal deve permitir valores máximos para estes dois parâmetros. O resultado da sorologia de animais naturalmente infectados por *T. canis*, *A. caninum* e *D. caninum* que são parasitos comumente encontrados em cães, além de soros de cães sabidamente não infectados, contra antígeno de parasito adulto de *A. vasorum*, mostrou reatividade cruzada no teste de ELISA indireto para o isotipo IgG. A sensibilidade e a especificidade encontrada para antígeno bruto de parasito adulto de *A. vasorum* foi de 100% e 79%, respectivamente.

Ao contrário do observado para antígeno bruto solúvel, o emprego da proteína purificada de 51 kDa elevou a especificidade do ELISA indireto para a pesquisa do anticorpo IgG. O resultado da sorologia obtida contra a proteína de 51 kDa, não mostrou reatividade para o isotipo IgG presente nos soros de cães naturalmente infectados por parasitos gastrintestinais, no qual a sensibilidade e a especificidade obtida foi de 100%.

O uso de proteínas purificadas tem elevado também a especificidade nos testes de diagnóstico de outras espécies de parasitos do gênero *Angiostrongylus*. A especificidade e a sensibilidade do teste de ELISA indireto contra antígeno bruto de parasito adulto de *A. costaricensis* foi de 76,2% e 91,1% respectivamente (GEIGER *et al.*, 2001). Porém, a utilização de proteína purificada de 20 kDa tem demonstrado alta especificidade na técnica de Immunoblotting (ABRAHAM *et al.*, 2004). Com relação a *A. cantonensis*, a utilização do antígeno bruto nos testes de ELISA indireto mostrou

100% de sensibilidade, porém, somente 66,8% de especificidade (CHEN, 1986; NUAMTAMONG, 1996). Por outro lado, a utilização das proteínas de parasito adulto de 29 e 31 kDa de *A. cantonensis* utilizando a técnica de Immunoblotting mostraram uma sensibilidade de 55,6%, especificidade de 99,4% e sensibilidade de 69,2% e especificidade de 82,4% respectivamente (NUAMTAMONG, 1996; MALEEWONG *et al.*, 2001). Todavia, EAMSOBHANA *et al.*, (2001), isolando a proteína de parasito adulto de 31 kDa de *A. cantonensis*, mostraram uma sensibilidade e especificidade de 100% no teste de ELISA indireto.

Diante destas considerações, pode-se entender que a reatividade cruzada entre antígenos de *A. vasorum* e outros helmintos existe e que esta reatividade foi reduzida após seleção de uma proteína específica do parasito. Adicionalmente, a avaliação da resposta humoral frente a esta proteína contribuirá para uma melhor utilização dos testes de imunodiagnóstico. No presente estudo foi mostrado que a proteína de 51 kDa específica de parasito adulto de *A. vasorum* foi purificada com sucesso através da técnica de cromatografia de imunoafinidade e que o uso desta proteína nos testes de diagnóstico para pesquisa de anticorpo IgG no soro de cães infectados por *A. vasorum* elevam os níveis de sensibilidade e especificidade dos testes imunológicos. Estes resultados sugerem a reprodutibilidade e a manutenção da reatividade desta proteína obtida por este processo de purificação. Claramente, a cromatografia de imunoafinidade é um método eficiente de purificação de pequenas quantidades de proteína. Todavia, um dos obstáculos no processo de purificação de antígenos bruto de helmintos é a dificuldade de se obter quantidade suficiente para os testes de imunodiagnóstico. Diante disso, dos 30 mg de antígeno bruto submetidas a metodologia de purificação, somente 0,22mg de proteína purificada foram obtidos a partir do antígeno total, um rendimento de 0,73%. Este valor foi inferior ao obtido por EAMSOBHANA *et al.*, (2001), ao purificar proteínas de *A. cantonensis* pelo método de eletroeluição de gel de SDS-PAGE, onde foram utilizados 12 mg de antígeno bruto e recuperado 0,49 mg de proteína purificada, um rendimento de 4,08%, porém condizente com os resultados de KUM & KO (1986) onde os autores obtiveram um rendimento de 0,14 % utilizando a técnica de cromatografia de imunoafinidade.

A proteína de 51 kDa mostrou-se bastante promissora nos testes de imunodiagnóstico. Assim, torna-se necessário a realização de testes imunológicos

utilizando a proteína de 51 kDa para a pesquisa por anticorpos IgM, IgA e IgE. Adicionalmente, existe a necessidade de caracterizar essa proteína obtendo-se a seqüência de aminoácidos que apresente ou não homologia com alguma proteína encontrada principalmente em helmintos. Assim, dando continuidade a deste trabalho, a caracterização desta proteína está sendo realizada com a colaboração do Dr. Mike Richardson da Divisão de Pesquisa da Fundação Ezequiel Dias. Adicionalmente, a produção de proteína recombinante para o uso em diagnóstico bem como a produção de anticorpos monoclonais a partir desta proteína purificada constitui uma segunda parte deste trabalho.

7-CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

A partir das informações obtidas neste estudo, pode-se concluir que:

1 - Os estádios evolutivos de *A. vasorum*, L1 e parasito adulto, expressam proteínas que são reconhecidas pelas classes de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE,

2 - O anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A. vasorum* demonstra uma resposta direcionada a uma grande quantidade de proteínas de parasito adulto durante todo o período de observação, ao contrário do que foi observado para os anticorpos IgM e IgA,

3 - Os anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de cães infectados por *T.canis*, *A.caninum* e *D. caninum* reagem fracamente com antígenos de parasito adulto de *A. vasorum* e o anticorpo IgE reage não somente com antígeno de parasito adulto, mas também com antígenos de L1,

4 - As proteínas de parasito adulto de 51, 63 e 209 kDa são mais frequentemente reconhecida pelo anticorpo IgG presente nos soros de cães experimentalmente infectados por *A.vasorum* e não apresentam reativas com anticorpo IgG presente nos soros de cães infectados por outros helmintos,

5 - A purificação de antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A.vasorum* evidenciou a proteína de 51 kDa,

6 - A proteína purificada de 51 kDa não mostrou reatividade cruzada com o anticorpo IgG presente nos soros de cães naturalmente infectados por parasitos gastrintestinais, no qual a sensibilidade e a especificidade obtida foi de 100%,

7 - A sensibilidade e a especificidade encontrada para antígeno bruto solúvel de parasito adulto de *A. vasorum* foi de 100% e 79% respectivamente.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.S.; SCHULZ-KEY, H.; GEIGER, S.M. Caracterización de antígenos de bajo peso molecular de *Angiostrongylus costaricensis*, reconocidos durante una infección experimental em roedores. **Parasitol. Latinoam**, v.59, p. 8-13, 2004.

ACEDO, C.S.; DIEZ, J.B.; MORALES, J.G. Angiostrongylosis canina. **Rev. Iber. Parasitol.**, v. 39, p. 135-142, 1979.

ALICATA, J.E. *Angiostrongylus cantonensis* (eosinophilic meningitis): historical event in its recognition as a new parasitic disease of man. **J. Washington Acad. Sci. Parasitol**, v. 39, p. 135-14, 1988.

ANDERSON, R.C. **Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission**, p. 175-183, 1992.

BAILLET, C.C. Strongle des vaisseaus et du coeur du chein *Strongylus vasorum* (Nobis). **N. Dict. Paract. Med. Vet.**, v. 8, p.587-588, 1866.

BARÇANTE, J.M.P. **Aspectos parasitológicos, clínicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados por *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamesnky, 1905**. 178p. 2004. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BESSA, E.C.A. **Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Protostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière, 1789 (Mollusca, Subulinidae) em condições de laboratório**. Tese de Doutorado, 103 p.1996. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG.

BHAIBULAYA, M.A. Comparative studies on the life history of *Angiostrongylus mackerrasae*, Bhaibulaya, 1968 and *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935). **Int. J. Parasitol.**, v.7, p.7-20, 1975.

BOLT, G.; MONRAD, J.; FRANDBSEN, F.; HENRIKESSEN, P.; DIETZ H.H. The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitol. Res.**, v. 79, n.5, p.428-430, 1993.

BOLT, G.; MONRAD, J.; KOCH, J.; JENSEN, A.L. Canine angiostrongylosis: a review. **Vet. Rec.**, v. 5, p. 447-452, 1994.

BOSSI, J.; WINGFIELD, W.E.; MILLER, C.W. Due casi odi carditi verminosa prodotta da un paticolare entozoa con accessi epilettiforme in due cani de caccia. **Gior. Med. Vet.**, v.19, n.7, p.300-303, 1871.

BRENNAN, S.F.; McCARTHY, G.; McALLISTER, H.; BASSET, H.; JONES, B.R. Clinical signs, diagnosis and treatment of three dogs with angiostrongylosis in Ireland. **Irish Vet. J.**, v. 57, n.2, p. 103-109, 2004.

BWANGAMOI, O. Renal lymphoid and pulmonary lesions in naturally acquired canine angiostrongylosis in Uganda. **Bull. Epizoot. Dis. Afr.**, v. 22, p. 55-68, 1974.

CARUSO, J.P.; PRESTWOOD, A.K. Immunopathogenesis of canine Angiostrongylosis: Pulmonary effects of Infection. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 11, p.85-92, 1988.

CHAPMAN, P.S.; BOAG, A.K.; GUITIAN, J.; BOSWOOD, A. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002). **J. Small. Anim. Pract.**, v. 45, n.9, p. 435-440, 2004.

CHEN, S.N. Enzyme- linked Immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p. 398-405, 1986.

CHYE, S.; CHANG, J.; YEN, C. Immunodiagnosis fo humam eosinophilc meningitis using an antigen of *Angiostrongylus cantonensis* L5 with molecular weight 204 kDa. **Acta Trop.**, v.75, p.9-17, 2000.

COBB, M.A.; FISHER, M.A. *Angiostrongylus vasorum*: transmission in south east England. **Vet. Rec.**, v.26, p. 529, 1990.

COPELAND, R.A. **Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols**. New York: Chapman & Hall, 1994.

CONBOY, G.A.; WHITNEY, H.; RALHAN, S. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in Newfoundland, Canadá, in Proceeding. 43rd An. Meet. Am. Assoc. **Vet. Parasitol**, v.78, 1997.

CONBOY, G.A. 2000. Canine Angiostrongilosis (French Heartworm). In: BOWMANN, D.D. **Companion and Exotic Animal Parasitology**. Ithaca NY: International Veterinary Information Service, 2000. Disponível em: <<http://www.ivis.org/advanges/parasit_bowman/conboy_angiostrongylosis/charper_frm.asp>>

COSTA, J.O. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: **considerações taxonômicas, patológicas e de diagnóstico imunológico (ELISA) em cães experimentalmente infectados**. 135p. 1992. Tese (Doutorado em Doenças Parasitárias). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COSTA, J.O.; LIMA, W. S.; NASCIMENTO, E. Immunodiagnosis by ELISA test of experimental canine angiostrongylosis. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zoot.**, v. 48, n.4, p.:491-495, 1996.

COSTA, J.O.; TAFURI, W.L. Estudos anátomo-patológicos de cães infectados experimentalmente pelo *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 49, n.4, p. 389-407, 1997.

COSTA, J.O.; COSTA, H.M.A.; GUIMARÃES, M.P. Redescription of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) and systematic revision of species assigned to the genera *Angiostrongylus* Kamensky, 1905 and *Angiocaulus* Schulz, 1951. **Rev. Méd. Vet.**, v.54, n.1, p.: 9-16, 2003.

CROSS, J. H.; CHO, J.C. H. ELISA for the detection of *Angiostrongylus cantonensis* antibodies in patients with eosinophilic meningitis. Southeast Asian **J. Trop. Med. Public Health**, v.13, p. 73-76, 1982.

CUILLÉ, J.; DARRASPEN, E. De la strongylose cardio-pulmonaire du chein. **Rev. Gen. Méd. Vét.**, v. 39, p.694-710, 1930.

CURY, M.C.; LIMA, W. S. Ocorrência de *Angiostrongylus vasorum* no rim de cão experimentalmente infectado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v. 47, n.4, p.593-595, 1995.

CURY, M.C.; LIMA, W. S.; VITOR, R.W.A. Enzyme-linked Immunosorbent assay for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infection in dogs. **Rev. Med. Vet.**, v. 147, n.7, p. 525-530, 1996.

CURY, M.C. **Angiostrongilose canina: avaliação das alterações sangüíneas, hepáticas, renais, pulmonares e cardíacas em cães inoculados experimentalmente com *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905.** 213p. 1999. Tese (Doutorado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CURY, M.C.; LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; MUZZI, R.A.L.; BREGUNCI, G.C. Radiology, Eletrocadiography and Echocardiography for the diagnosis of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infection in dogs. **Rev. Med. Vet.**, v.152, p.153-156, 2001.

CURY, M.C.; GUIMARÃES, M.P.; LIMA, W.L.; VITOR, R.W.A. Western blot analysis of the humoral response of dogs experimental infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Vet. Parasitol.**, v. 106, p.83-87, 2002.

DHARMKRONG-AT, A; SIRISINHA, S. Analysis of antigens from different developmental stages of *Angiostrongylus cantonensis*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.**, v. 4, n.2, p. 154-62, 1983.

DARRASPEN, E.; FLORIO, R.; GUEDOT, B. Eletrocardiographie et strongylose cardio-pulmonarie du chien. **Rev. Med. Vet.**, v. 16, p.674-689, 1953.

DODD, K. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) infestation in a Greyhound Kennels. **Vet. Rec.**, v. 92, p.195-197, 1973.

EAMSOBHANA, P.; YOOLEK, A.; SUVOUTTHO, S.; SUVOUTTHO, S. Purification of a specific immunodiagnostic *Parastrongylus cantonensis* antigen by electroelution from SDS- polyacrylamide gels. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 32, n.2, p. 308-312, 2001

ECKERT, J.; LÄMMLER, G. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. **Z. Parasitenk.**, v.39, p.303-322, 1972.

FEHRINGER, W.T.; FIEDLER, H.H. Dois novos casos de *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) do cão (*Canis familiaris*) em Salvador. **Arq. Esc. Med. Vet. Salvador**, v. 2, p.110-114, 1977.

FERREIRA-NETO, J.M.; MAGALHÃES, L.M. **Patologia Clínica Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, 279 p, 1982.

FREDES, F.; GORMANT, T.; SILVA. M.; ALCAINO, H. Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western Blot y ELISA em animales infectados. **Arch. Med. Vet.**, v. 29; p. 283-294, 1997.

FUJII, T. *Angiostrongylus cantonensis*: Immunoblotting analysis of the antigens recognized by rats. **Parasitol. Res.**, v.73, p.366-374, 1987.

FUJII, T. Immunoblotting analysis of the circulating antigens occurring in serum of rats infected with *Angiostrongylus cantonensis*. **Parasitol. Res.**, v.74, p.476-483, 1988.

GEIGER, S.M.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SOBOSLAY, P.T.; SCHULZ-KEY, H. Experimental *Angiostrongylus costaricensis* infection in mice: immunoglobulin isotype responses and parasite-specific antigen recognition after primary low-dose infection. **Parasitol. Res.**, v. 85, p. 200-205, 1999.

GIOVANNONI, M.; FERNANDEZ, B. F.; KAVINSKI, L. C. Angiostrongilose do cão. **Arq. Biol. Tec. Paraná**, v. 28, n.4, p.601-604,1985.

GONÇALVES, P. C. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866), novo parasita do cão do Rio Grande do Sul (Brasil). (Nematoda: Metastrongyloidea). **Rev. Agron. e Vet. Univ. Rio Grande do Sul**, v. 4, p.35-40, 1961.

GOMEZ-MUNOZ, M.T.; CUQUERELLA, M.; ALUNDA, J.M. Identification and partial purification of a 26 kilodalton antigen of adult *Haemonchus contortus*. **Int. J. Parasitol.**, v. 26, n. 3, p. 311-318, 1996.

GRAEFF- TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H.L. Angiostrongilíase abdominal – Nova parasitose no sul do Brasil. **R. AMRIGS, Porto Alegre**, v.35, n. 2, p. 91-98, 1991.

- GRAEFF- TEIXEIRA, C.; AGOSTINI, A.A.; CAMILLO-COURA, L.; FERREIRA-CRUZ, M.F.F. Seroepidemiology of abdominal angiostrongyliasis: the standardization of antibodies in two localities in Southern Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 2, n.3, p.: 254-260, 1997.
- GUILHON, J. Rôle des limacides dans le cycle évolutif d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Compt. Rend. Acad. Sci.**, v. 251, p.2252-2253, 1960.
- GUILHON, J.; CENS, B. Essais de transmission d'*Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) du chat. **Comp. Rend. Acad. Sci.**, v. 271, p.936-939, 1970.
- GUILHON, J.; BENEX, J.; MISHRA, G. S. Premiers essais de diagnostic immunologique de l'angiostrongylose canine à *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 64, n.2, p.220-228, 1971.
- GUILHON, J.; CENS, B. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Etude biologique et morphologique. **Ann. Parasitol.**, v.48, n.4, p.567-596, 1973.
- HORTA-DUARTE, F.; VIEIRA, F.M.; BESSA, E.C.A.; LIMA, S.S.; LOUZADA, G.L. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905 (Nematoda: Angiostrongylidae) em *Cerdocyon Thous* (Carnívora: Canidae): primeira ocorrência no Estado de Minas Gerais, Brasil. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2005.
- INTAPAN, P.M.; MALEEWONG, W.; SAWANYAWISUTH, K.; CHOTMONGKOL. Evaluation of human IgG subclass antibodies in the serodiagnosis of angiostrongyliasis. **Parasitol. Res.**, v. 89, p.425-429, 2003.
- JACOBS, D. E.; PROLE, J. H. B. *Angiostrongylus vasorum* and others nematodes in British Greyhounds. **Vet. Rec.**, p. 22:180, 1975.
- JONES, G.W.; NEAL, C.; TURNER, G.R.J. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in Cornwall. **Vet. Rec.**, p.26:83, 1980.
- KAMENSKY, S. N. Sistematicheskoe polozhenieradov *Metastrongylus* wots in *Protostrongylus* g. n. sredi drugikh Strongylidae. **Sbrnik. Ttrudov Kkhard'kov. Vet. Insti.**, v. 7, n.2, p.17-20, 1905.
- KAMIYA, M.; THARAVANIJ, S.; HARINASUTA, C. Antigenicity for hemagglutination and immunoelectrophoresis test in fractionated antigens from *Angiostrongylus cantonensis*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.**, v. 4, p.187-194, 1973.
- KING, M.C.A.; GROSE, R.M.R.; STARTUP, G. *Angiostrongylus vasorum* in the anterior chamber of a dog's eye. **J. Small Anim. Pract.**, v. 35, p. 326-328, 1994.
- KRIEK, J.G. *Angiostrongylus vasorum* in a dog in Surrey. **Vet. Rec.**, v. 148, n.5, p.156, 2001.

- KUM, W.W. S.; KO, R.C. Isolation of specific antigens from *Angiostrongylus cantonensis*. 1- Preparative flatbed isoelectric focusing. **Z. Parasitenkd**, v. 71, p. 789-800, 1985.
- KUM, W.W. S.; KO, R.C. 2- Isolation of specific antigens from *Angiostrongylus cantonensis*. 2- By affinity chromatography. **Z. Parasitenkd**, v. 72, p. 511-516, 1986.
- LAEMMLI, U.R. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LANGENEGGER, J.; LANGENEGGER, A. M.; DARCO SO FILHO, P.; GOUVEIA, G. L. A. Ocorrência da infestação por *Angiostrongylus vasorum* em cães do Rio de Janeiro. **Anestésico local. VII Cong. Brasil. Vet.**, p. 246-247, 1962.
- LAULANIÈ, F. Sur quelques affection parasitaire du poumon et leus rapport avec la tuberculose. **Arch. Physiol. Norm.Pathol.**, p.487-522, 1884 *apud* ECKERT, J.; LÄMMLER, G. Angiostrongylose bei Mensch und Tier. **Z. Parasitenk.**, v.39, p.303-322, 1972.
- LAYNE, E. **Methods in Enzimology**. New York: Colowick, S.P.& Kaplan, V.III, p. 447-454, 1957.
- LIMA, W. S.; COSTA, H. M. A.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. R. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Nematoda: Prothostrongylidae em cães de Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, n.2, p.233-235, 1985.
- LIMA, W.S.; GUIMARÃES, M.P.; LEMOS, I.S. Occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in the lungs of Brazilian fox *Dusicyon vetulus*. **J. Helminthol.**, p. 68:87, 1994.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, p. 265-275, 1951.
- LYNCH, Y. *Angiostrongylus vasorum* in the dog. **Vet. Rec.**, v. 49, n.17, p.470, 1977.
- MAHAFFEY, M.B.; LOSONSKY, J.M.; PRESTWOOD, A.K.; MAHAFFEY, E.A.; LEWIS, R.E. Experimental Canine Angiostrongylosis: II. Radiographic Manifestations. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 17, p. 499-502, 1981.
- MALEEWONG, W.; SOMBATSAWAR, P.; INTAPAN, P.M.; WONGKHAM, C.; CHOTMONGKOL, V. Immunoblotting evaluation of the specificity of the 29 kDa antigen from young adult female worms *Angiostrongylus cantonensis* for immunodiagnosis of human angiostrongyliasis. **Asian Pac. J. Allergy Immunol.**, v.19, n.4, p.267-273, 2001.
- MARTIN, M.W.S.; ASHTON, G.; SIMPSON, V.R.; NEAL, C. Angiostrongylosis: in Cornwall clinical presentations of eight cases. **J. Small Anim. Prac.**, v.34, p. 20-25, 1993.

McCARTHY, J.; MOORE, T.A. Emerging helminth zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1351-1360, 2000.

MELLO, M.F.V.; FERREIRA, A.M.R. Análise citológica do líquido de lavagem broncoalveolar para o diagnóstico das doenças pulmonares caninas – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 42, p. 52-58, 2003.

MOREIRA, P. Angiostrongilíase abdominal – um problema de saúde pública. **Rev.Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 21, n.2, p. 45-90 *apud* GRAEFF- TEIXEIRA, C.; CAMILLO-COURA, L.; LENZI, H.L. Angiostrongilíase abdominal – Nova parasitose no sul do Brasil. **R. AMRIGS, Porto Alegre**, v.35, n. 2, p. 91-98, 1991.

MIGAUD, P.; MARTY, C.; CHARTIER, C. What is your diagnosis? *Angiostrongylus vasorum* infection in a dog. **Point. Vet.**, v. 23, n.141, p.989-991, 1992.

MISHRA, G. S.; BENEX, J. Immunological specificity of *Angiostrongylus cantonensis* and *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda). **Indian J. Anim. Sc.**, v. 42, n.8, p.614-617, 1972.

NEGRÃO-CORRÊA, D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 43, n.5, p. 291-299, 2001.

NUAMTANONG, S. The avaluation of the 29 and 31 KDa antigens in female *Angiostrongylus cantonensis* for serodiagnosis of human angiostrongyliasis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, v. 27, n.2, p.: 291-296, 1996.

OLIVEIRA-JUNIOR, S.D.; BARÇANTE, J.M.P.; BARÇANTE, T.A.; RIBEIRO, V.M.; LIMA, W.S. Ectopic location of adult worms and fist-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 121, n. 26, p.293-296, 2005.

PALLASKE, G. Zur Angiostrongylose des Hundes. **Deuts. Tier.**, v. 74, p.166-167, 1967.

PATTESON, M.W.; GIBBS, C.; WOTTON, P. R.; DAY, M. J. *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs. **Vet. Rec.**, v. 133, n.4, p.565-570, 1993.

PASTORET, P.P.; GRIEBEL, P.; BRAZIN, P.H.; GOVAERTS, A. Immunology of the dogs. In: **Handbook of vertebrate immunology**. San Diego: Academy Press, cap. VII, p. 262-287, 1998.

PERRY, A. W.; HERTLING, R.; KENNEDY, M. J. Angiostrongylosis with disseminated larval infection associated with signs of ocular and nervous disease in an imported dog. **Canadian Vet. J.**, v. 32, n.7, p.430-431, 1991.

PIEN, F.D.; PIEN, B.C. *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 3, p.161-163, 1999.

- POLI, A.; ARISPICI, M.; MARCONCINI, A.; MANCIANTI, F.; MONTE, D. *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy. **J Wildl. Dis.**, v.20, n.4, p.345-6, 1984.
- PRESTWOOD, A. K.; GREENE, C. E.; MAHHAFHEY, E. A.; BURGESS, D. E. Experimental canine angiostrongylosis: pathologic manifestations. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 17, n.3, p.491-497, 1981.
- RAILLET, A.; HENRY, A. Sur les variations des Strongyles de l'appareil respiratoire de mammifères. **C. R. Soc. Bio.**, v. 63, n.38, p.751-753, 1907.
- RAMSEY, J.D.; LITTLEWOOD, J.D.; DUNN, J.K.; HERRTAGE, M.E. Role of chronic disseminated intravascular coagulation in a case of canine angiostrongylosis. **Vet. Rec.**, v. 138, p. 360-363, 1996.
- REVILLA-NUÍN, B.; MANGA-GONZÁLEZ, M,Y.; MINAMBRES, B.; GONZÁLEZ-LANZA, C. Partial characterization and isolation of 130 KDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. **Vet. Parasitol.**, v.134, p. 229-240, 2005.
- ROBERTS, F.H. S. Notes on some helminthes infesting domestic animals in case report. **Irish Vet. J.**, v.16, p.30-33, 1940.
- ROSEN, L.; ASH, L. R.; WALLACE, G. D. Life history of the canine lungworm *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866). **Am. J. Vet. Res.**, v. 31, p.131-143, 1970.
- ROSSI, C.L. TAKAHASHI, E.E.; TEIXEIRA, A.L.; BARROS-MAZON, S.; TREVISAN, R.C. Avaliação de preparações antigênicas de *Strongyloides stercoralis* para o imunodiagnóstico da estrogiloidíase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 26, p. 83-87, 1993.
- SAUERLANDER,R.; ECKERT, J. The African giant snail (*Achatina fulica*) as experimental intermediate host of *Angiostrongylus vasorum* (Nematoda) (author's transl). **Z Parasitenkd.**, v. 44, p.59-72, 1974.
- SCHELLING, C.G.; GREENE, C.E.; PRESTWOOD, A.K. Coagulation abnormalities with acute *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs. **Am. Journal Vet. Res.**, v.7, n.2, p.2669-2673, 1986.
- SEGOVIA, J.M.; TORRES, J.; MIGUEL, J.; LIANEZA, L.; FELIU. C. Helminths in the wolf, *Canis lupus*, from north-western Spain. **J. Helminthol.**, v.75, n.2, p. 183-192, 2001.
- SERRES, E. Entozoaires trouvés dans l'oreillette droite du coeur, le ventricule correspondant et l'artère pulmonaire du chien. **J. des Vet. du Midi. Toulouse**, v.2, n.7, p.70-72, 1854.

SIMPSON, V.R. *Angiostrongylus vasorum* infection in foxes (*Vulpes vulpes*) in Cornwall. **Vet. Rec.**, v. 2, p.443-445, 1996.

SIMPSON, V.R.; NEAL, C. *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs and slugs. **Vet. Rec.**, v. 25, p. 303-304, 1982.

SOARES, J.F.; SIQUEIRA, A.L. **Introdução à Estatística Médica**. 1º Ed. Belo Horizonte: Departamento de Estatística, Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

SRÈTER, T.; SZELL, Z.; MARUCCI, G.; POZIO, E.; VARGA, I. Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. **Vet. Parasitol.**, v.115, p.329-334, 2003.

SUZUKI, T.; SATO, Y.; YAMASHITA, T.; SERIKAWA, H.; OTSURU, M. *Angiostrongylus cantonensis*: Preparation of a specific antigen using immunoadsorbent columns. **Exp. Parasitol.**, v. 38, p. 191-201, 1975.

TRAVASSOS, L. Nematódeos novos. **Bol. Biol. São Paulo**, v. 6, p.52-61, 1927.

TORRES, J.; MIGUEL, J.; MOTJÉ, M. Helminth parasite of the eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographic approach. **Parasitol. Res.**, v. 87, p.259-263, 2001.

YAMAGUTI, S. Systematic survey of nematodes of vertebrates and their host relationship. In: **Systema helmintum; the nematodes of vertebrates**. New York: Interscience Publishers v. 3, pt. 2, p. 681-704, 1961.

YANG, H.; CHUN, Y. Immunolocalization of the 150 kDa protein in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. **Korean J. Parasitol.**, v. 42, n. 2, p. 81-84, 2004.

YEN, C.; CHEN, E. Detection of antibodies to *Angiostrongylus cantonensis* in serum and cerebrospinal fluid patients with eosinophilic meningitis. **Int. J. Parasitol.**, v. 23, n.1, p. 17-21, 1991.

WAISBERG, J.; CORSI, C.E.; REBELO, M.V.; VIEIRA, V.T.T., BROMBERG; S.H., SANTOS, P.A., MONTEIRO, R. Jejunal perforation caused by abdominal angiostrongyliasis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, n. 3, p.325-328, 1999.

WILLIAMS, J. F.; LIDERMAN, B.; PADGET, G. A.; SMITH, O. L. *Angiostrongylus* in a Greyhound. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.186, n.10, p.1101-1103, 1985.

WILLINGHAM, A.L.; OCKENS, N.W.; KAPEL, C.M.O.; MONRAD, J. A helminthological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the metropolitan area of Copenhagen. **J. Helminthol.**, v. 70, p. 259-263, 1996.

9-ANEXOS

ANEXO I

Soluções utilizadas na eletroforese em gel de poliacrilamida

Tampão de corrida	
Tris base	15,15 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	5000 mL

Tampão de Amostra 2x	
SDS	0,23 g
Tampão do gel de concentração	1,25 mL
Glicerol	2 mL
2- mercaptoetanol	0,5 mL
Azul de bromofenol	100 µL
H ₂ O bidestilada q.s.p	10 mL

Tampão do Gel de Concentração	
Tris base	12,10 g
SDS	0,80 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL
Acertar pH para 6,8 com HCl 5N	

Tampão do Gel de Resolução	
Tris base	36.33 g
SDS	0,80 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL
Acertar pH para 8,8 com HCl 5N	

Solução de Acrilamida	
Acrilamida	30 g
Bis acrilamida	0,80 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL

Solução de Persulfato de Amônio 10%	
Persulfato de Amônio	0,30 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	3,0 mL

Solução Corante para Proteínas	
Brilhan Blue	1,25 g
Ácido Acético Glacial	35 mL
Metanol	250 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p	500 mL

Solução Descorante para as Proteínas	
Ácido Acético Glacial	70 mL
Metanol	100 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL

ANEXO II

Soluções utilizadas na técnica de “Immunoblotting”

Solução de Transferência	
Tris base	12,11 g
Glicina	57,67 g
Metanol	800 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL

Solução de Ponceau's 1%	
Ponceau's	1g
Ácido Acético Glacial	10 mL
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL

“Phosphate Buffer Saline”- PBS Solução estoque 1 M pH 7,4	
KH ₂ PO ₄	2g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	28 g
NaCl	2 g
KCl	2 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL

PBS Tween – 20 0,05% (PBST)	
Tween – 20	0,5 mL
PBS 0,1 M pH 7,2 q.s.p	1000 mL

Solução substrato	
(a)3,5- Diaminobenzidina	12 mg
PBS	12 ml
(b)4-cloro-1-naftol	06 mg
Metanol	02mL
PBS 0,1M pH7,4	10 mL

Misturar (a) e (b) e acrescentar 10µL de Peróxido de Hidrogênio 30 %

ANEXO III

Soluções utilizadas na preparação da coluna de Sepharose CL 4B

Tampão de ligação 0,1M Carbonato de Sódio pH8, 3 com 0,5M NaCl	
Na ₂ CO ₃	0,098 g
NaHCO ₃	8,32 g
NaCl	29,22g
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL

Tampão Acetato 0,1M Acetato pH4, 0 com 0,5M NaCl	
A) Ácido Acético Glacial	1,15 mL
H ₂ O bidestilada	98,85 mL
B) Acetato de Sódio Anidro	1,64 g
H ₂ O bidestilada	98,36 mL
Adicionar 41 mL da solução A e 9 mL da solução B e completar para 100 mL de H ₂ O bidestilada	

Etanolamina 1 M pH 8,0	
Etanolamina	3,0 mL
HCl concentrado	4,0 mL
H ₂ O bidestilada	20 mL
Completar o volume para 50 mL e medir o pH	

Tampão Tris-HCl 1 M pH8,0	
A) Tris base	121,1 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL
Ajustar o pH para 8,0 com HCl concentrado	

ANEXO IV

Soluções utilizadas no ELISA indireto

Tampão de Cobertura 0,1M pH 9,6	
1- Na ₂ CO ₃	2,12 g/ 100 mL de H ₂ O destilada
2- Na ₂ HCO ₃	3,35 g/ 200 mL de H ₂ O destilada
Misturar 80 mL da solução 1 e 170 mL da solução 2	

Solução de Bloqueio (1)	
BSA	1 g
Tween 20 0,05% em PBS 0,1M	100 mL

Solução de Bloqueio (2)	
Caseína	2 g
PBS 0,1M pH7, 4	100 mL

Solução de Lavagem	
Tween 20 0,05% em PBS 0,1M	1000mL

Tampão de Diluição (1)	
Solução de bloqueio (1)	10 mL
Tween 20 0,05% em PBS 0,1M	90 mL

Tampão de Diluição (2)	
Caseína	0,25 g
Tween 20 0,05% em PBS 0,1M	100 mL

Tampão Citrato pH 5,0	
NaH ₂ PO ₄	13,41 g
Ácido Cítrico	5,19 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	1000 mL

Solução substrato-reveladora

Tampão Citrato	10 mL
OPD	54 mg
H ₂ O ₂ 30%	2μl

ANEXO V

Soluções utilizadas na preparação da coluna de Proteína A

Borato de Sódio 0,2M pH 9,0 Solução estoque	
A) Ácido Bórico	12,4 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL
B) Borato de Sódio	19,05 g
H ₂ O bidestilada q.s.p	100 mL
Adicionar 50 mL da solução A acrescida de 59 mL da solução B e completar para 200 mL	

ANEXO VI

Soluções utilizadas na coloração por Nitrato de Prata

Dicromato de Potássio	
$K_2Cr_2O_7$	100 mg
HNO_3 65%	28 μ L
H_2O bidestilada q.s.p	100 mL

Nitrato de Prata	
$AgNO_3$	200 mg
H_2O bidestilada q.s.p	100 mL

Carbonato de Sódio	
Na_2CO_3	3 g
HCHO 40%	50 μ L
H_2O bidestilada q.s.p	100 mL

Preparar na hora do uso

Solução Fixadora	
Metanol	30 mL
Ácido Acético Glacial	10 mL
H_2O bidestilada	60 mL

ANEXO VII

Lei 6.638, 08 de maio de 1979 **Normas para Prática Didático-Científica da Vivisseção de Animais**

Art. 1º – Fica permitida, em todo o território nacional, a vivisseção de animais, nos termos desta lei.

Art. 2º – Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgãos competentes e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º – A vivisseção não está permitida:

- I. sem o emprego de anestesia
- II. em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competentes
- III. sem supervisão de técnico especializado
- IV. com animais que não tenham permanecido mais de 15 (quinze) dias em biotérios legalmente autorizados
- V. em estabelecimentos de ensino de 1º e 2º grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade

Art. 4º- O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgico, quando, durante ou após a vivisseção, receber cuidados especiais

§ 1º Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições.

§ 2º Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30 (trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por ele queiram responsabilizar-se

Art. 5º – Os infratores desta Lei estarão sujeitos:

- I. às penalidades cominadas no artigo 64, caput, do Decreto – lei 3,688 de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração
- II. à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência

Art. 6º – O poder Executivo, no prazo de 90 (noventa) dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

- I. órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstrações com animais vivos
- II. as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios
- III. órgão e autoridade competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso

Art. 7º – Esta lei entra em vigor a partir da data de sua publicação

Art. 8º – Revogam-se as disposições em contrário.

ANEXO VIII - Gêneros de helmintos recuperados após a necrópsia de cães capturados pelo Centro de Zoonoses da Prefeitura de Belo Horizonte – MG.

Animal	Número de espécimes de helmintos adultos recuperados após necrópsia de cães			
	<i>Toxocara</i>	<i>Ancylostoma</i>	<i>Dipylidium</i>	<i>Angiostrongylus</i>
1	17	0	0	0
2	18	0	0	0
3	3	0	0	0
4	48	0	0	0
5	35	0	0	0
6	25	1	0	0
7	74	5	0	0
8	82	12	0	0
9	19	10	0	0
10	13	6	0	0
11	15	10	9	0
12	18	2	10	0
13	8	3	4	0
14	10	6	6	0
15	8	4	1	0
16	10	0	0	0
17	16	0	0	0
18	55	0	0	0
19	37	0	0	0
20	14	0	0	0
21	6	46	0	0
22	17	51	0	0
23	59	3	0	0
24	26	47	0	0
25	22	1	0	0
26	19	95	3	0
27	28	1	6	0
28	19	2	11	0
29	55	13	7	0
30	6	8	9	0
31	40	14	0	0
32	36	20	0	0
33	50	14	0	0
34	3	3	0	0
35	18	2	0	0
36	46	5	0	0
37	68	8	0	0
38	0	2	0	0
39	15	55	0	0
40	15	43	0	0
41	4	3	0	0
42	3	22	0	0
43	45	30	0	0
44	12	15	5	0
45	7	5	0	0
46	2	3	0	0
47	28	64	6	0
48	26	11	0	0
49	7	3	4	0
50	3	0	0	0
51	7	49	0	0
52	23	34	0	0
53	6	8	0	0
54	37	0	0	0
55	177	1	0	0
56	18	0	99	0
57	10	6	6	0
58	15	9	12	0
59	48	6	16	0
60	12	0	0	0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **060/03** relativo ao projeto intitulado "Avaliação de parâmetros imunológicos e moleculares de cães experimentalmente infectados com *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905" que tem como responsável Walter dos Santos Lima, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal** (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **17.03.2004**.

Este certificado expira-se em **17.03.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **060/03** related to the project entitled "Evaluation of immunological and molecular parameters in dogs with experimental infection with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905", under the supervision of Walter dos Santos Ribeiro is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation** (CETEA/UFMG) and was approved in **17.03.04**.

This certificate expires in **17.03.2009**

Belo Horizonte, 17 de março de 2004


Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE
/ Presidente do CETEA/UFMG



**Identification of stage-specific proteins of *Angiostrongylus vasorum*
(Baillet, 1866) Kamensky.**

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	PR-2007-0007
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	07-Jan-2007
Complete List of Authors:	Vasconcelos, Viviane; Universidade Federal de Minas Gerais Vitor, Ricardo; Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia
Keywords:	<i>Angiostrongylus vasorum</i> , dog, immunoblotting, immunodiagnostics



Preview**From:** chob@andrews.edu**To:** vivianeleo@hotmail.com**Cc:****Subject:** Parasitology Research - Manuscript ID PR-2007-0007 (SY-05)**Body:** @@date to be populated upon sending@@

Dear Vasconcelos:

Your manuscript entitled "Identification of stage-specific proteins of *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Parasitology Research.

Your manuscript ID is PR-2007-0007.


Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/parasite> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/parasite>.

Thank you for submitting your manuscript to the Parasitology Research.

Sincerely,
Parasitology Research Editorial Office

Date Sent: 07-Jan-2007

 Close Window