UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Reatividade específica e cruzada de antígenos de *Echinococcus granulosus* e *Taenia crassiceps* utilizando amostras de pacientes com hidatidose e neurocisticercose

Fabiana Érica Vilanova da Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2007

Fabiana Érica Vilanova da Silva

**Reatividade específica e cruzada de antígenos de *Echinococcus granulosus* e
Taenia crassiceps utilizando amostras de pacientes com hidatidose e
neurocisticercose**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo para obtenção do grau de MESTRE em
Farmácia.

Área de Concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Profa. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013310

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Silva, Fabiana Érica Vilanova da
S586r Reatividade específica e cruzada de antígenos de *Echinococcus granulosus* e *Teania crassiceps* utilizando amostras de pacientes com hidatidose e neurocisticercose / Fabiana Érica Vilanova da Silva. -- São Paulo, 2007.
89p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Vaz, Adelaide José

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Doenças parasitárias I.
T. II. Vaz, Adelaide José, orientador.

616.0756-9 CDD

Fabiana Érica Vilanova da Silva

**Reatividade específica e cruzada de antígenos de *Echinococcus granulosus* e
Taenia crassiceps utilizando amostras de pacientes com hidatidose e
neurocisticercose**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Associada Adelaide José Vaz
orientador/presidente

Kioko Takei
1º examinador (a)

Guita Rubinky Elefant
2º examinador (a)

São Paulo, 12 de dezembro de 2007.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Processo 134745/2005-1.

“Nenhuma mente que se abre para uma nova
idéia voltará a ter o tamanho original”.

Albert Einstein

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia e a minha família, especialmente minha mãe e minha vovó Raimunda, pelo amor, dedicação e eterna fonte de estímulo.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Profa. Dra. Adelaide José Vaz**, grande conhecedora das Ciências da Saúde, em especial a Imunologia, pela **ACOLHIDA** em seu laboratório, oportunidade de iniciar o curso de pós-graduação, amizade, paciência e pela disponibilidade e capacidade de orientação, que enriqueceram meu conhecimento tanto na área da pesquisa como na profissional;

À Profa. Dra. Kioko Takei, pela amizade, simplicidade, delicadeza, atenção e harmonia, sempre presentes no dia-a-dia e pela leitura e sugestões pertinentes nesse trabalho;

À Profa. Dra. Guita Rubinsky Elefant, Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pelas sugestões valiosas no exame de qualificação e por ceder as amostras de toxocaríase, de suma importância na realização desse trabalho e por toda a atenção e amizade;

À Dra. Laura Kamenetzky do Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Microbiologia Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina, em gentilmente ceder o antígeno recombinante de *E. granulosus*, essencial na realização desse trabalho e por sua atenção;

À Dra. Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre, Rio Grande do Sul), em ceder as amostras de pacientes com hidatidose e o líquido hidático de *E. granulosus*, essenciais na realização desse trabalho e por sua atenção;

Aos Profs. Drs. José Antônio Livramento, Luís dos Ramos Machado e Osvaldo Massaiti Takayanagui por encaminhar as amostras de soros humanos de pacientes com neurocisticercose ao Laboratório de Imunologia Clínica/USP, tornando possível a realização desse trabalho;

À Dra. Márcia Ishida da Universidade Federal de Santa Catarina em ceder as amostras de pacientes com *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* e *Shistosoma mansoni*, importantes na realização desse trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica da FCF/USP:

Noeli Maria Espíndola:... a PHD em anticorpos monoclonais... ninguém tem mãos para produzir monoclonais tão bons iguais aos dela... a grande energia do laboratório.... sempre dedicada, não só aos alunos do laboratório mas a todos que a

procurava... Muito obrigada por toda a amizade, atenção, dedicação, carinho, confiança e ensinamentos...

Rosa Palmira Jácobo Goebbels:... famosa por seus géis e blots maravilhosos... Obrigada por sua amizade e dedicação;

Cristiane Rocha de Farias:... sempre atenciosa e dedicada... e a chamamos de "nossa Cris"... Obrigada por tudo que me ensinou, pela atenção e por sua amizade;

Andréia Bartachini Gomes:... sempre rápida e muita ágil... foi sempre assim desde que a conheci... Obrigada pela amizade, dedicação e carinho;

Elói M. Lago:...como invejo a sua calma e tranquilidade... Obrigada por toda atenção, carinho e incentivo;

Alberto Iha:...aquele jeitinho calado... mas me ensinou muito no laboratório... fiquei craque no preparo de soluções. Obrigada pela dedicação e amizade;

Fabyana Maria dos Anjos:... "será que"... ela adorava essa frase... queria sempre mudar o protocolo... estava dando tudo certo, mas ela não deixava essa frase. Obrigada pelo companheirismo e amizade;

Edward José de Oliveira:... pensava que era só ele que chegava cedinho no laboratório... que nada... tinha dia que eu ganhava dele... pessoa muito centrada em seus objetivos... e hoje pesquisador da FIOCRUZ-MG. Obrigada pela amizade e carinho;

À amiga Maria da Glória Teixeira de Sousa, pela acolhida, dedicação, incentivo e toda a amizade durante esses dez longos anos. A amiga que tenho muito carinho e gratidão;

Ao amigo Francisco Erivaldo Vidal Barros, pelo carinho, dedicação e amizade;

Ao Dr. Jackson Maurício Lopes Costa (FIOCRUZ-BA), pela amizade e por todo apoio desde a minha vida acadêmica até os dias de hoje. Obrigada por todas as oportunidades proporcionadas;

À Mônica Elinor Alves Gama (UFMA), pela amizade e por todas as grandes oportunidades: participar da equipe de pesquisa com os alunos de Medicina em Buriticupu-MA, trabalhar no Pólo e a maior de todas, vir para São Paulo, onde pude fazer meu mestrado e dar um grande passo para o meu crescimento profissional e pessoal;

À Cláudia Maria de Castro Gomes pela amizade, pelo acolhimento e carinho, dedicação e amizade;

Ao Laboratório de Investigação Médica (LIM-50) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial o prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Corbett, profa. Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes, profa. Dra. Márcia Dalastra, Thaíse

Tomokane, Mussya Rocha, Daniela Larangeira, Felipe Passero, Ana Carolina Stocco e Lia Negrão;

Aos amigos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão: Carlos Augusto, Cybelle, Glória e Wankleia, pela amizade e companheirismo, presentes até hoje;

Aos amigos do curso de especialização em Microbiologia Clínica do Centro Universitário do Maranhão: Ana Cégila, Ary, Wankleia e Wilma, pela amizade e carinho;

À profa. Azizedite Gonçalves e Família, pela amizade, carinho, dedicação e palavras amigas por todos esses anos;

À Thaíse Tomokane, pela amizade e carinho;

À Maria Cristina Cabral Garcia, pela amizade, auxílio e carinho;

Aos amigos do Mestrado Andréia, Fabyana, Lídio, Mayara, Renata e Rosa, entramos juntos nessa jornada e compartilhamos nossas preocupações, ansiedades e vitórias;

À profa. Lígia Ferreira Gomes pela amizade, carinho e atenção;

À Elisângela, Júlia, Fernanda e Carolina pela amizade e pelos momentos descontraídos no laboratório de Imunologia Clínica;

À Dorlei e Carmen pelas nossas conversas “cedinho da manhã e no horário do almoço”, onde falávamos de nossas famílias e do dia-a-dia. Obrigada pelo incentivo, amizade e carinho;

Às funcionárias da secretaria de graduação da FCF/USP, especialmente Edna e Ana, pela dedicação e amizade;

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação da FCF/USP, Elaine e Jorge, pela amizade;

Aos funcionários do LAC-FCF/USP: Renata, Mariano, Fábio e Maurício;

À Alziana Moreno pelos momentos agradáveis e por ter dividido o “muquifinho”;

Aos amigos da COVISA (Coordenação de Vigilância em Saúde), em especial Gislene Maria Oliveira Luz e à Subgerência de Medicamentos, pela amizade, dedicação, estímulo e companheirismo;

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro;

A todos àqueles que acreditaram e confiaram em mim.

RESUMO

SILVA, F.E.V. **Reatividade específica e cruzada de antígenos de *Echinococcus granulosus* e *Taenia crassiceps* utilizando amostras de pacientes com hidatidose e neurocisticercose.** São Paulo, 2007. 89p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Os estudos de reatividade dos antígenos de líquido hidático de *Echinococcus granulosus* (Ag LH-Eg) e de líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (Ag LV-Tcra) foram feitos com anticorpos monoclonais (AcMos) anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* e amostras humanas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e immunoblot. O SDS-PAGE mostrou um padrão complexo de proteínas entre 97- e 8-kDa do LH-Eg e 97- e 14-kDa do LV-Tcra. A caracterização dos antígenos com os AcMos por ELISA mostrou que todos os AcMos anti-*E. granulosus* reagiram com o antígeno LH-Eg e um deles cruzadamente com o antígeno LV-Tcra. Um dos dois AcMos anti-*T. crassiceps* reagiu também com o LH-Eg. A reatividade do LH-Eg com amostras humanas apresentaram melhores resultados com o *cut off* média mais dois desvios-padrão (M+2DP) e na diluição 1:250. As amostras de hidatidose (Hi) mostraram reatividade máxima (100%) nessa diluição. As amostras neurocisticercose (NC) ensaiadas por ELISA-LH-Eg, apresentaram reatividade cruzada de 66,5%, teníase (T) 46%, controle negativo (CN) 4% e outras parasitoses (OP) 84,5%. O ELISA-LV-Tcra mostrou 100% de reatividade com as amostras NC na diluição 1:50 pelo *cut off* TgRoc. Com as amostras hidatidose, teníase, outras parasitoses e controle negativo a reatividade foi de 73,5; 61,5; 69 e 2%, respectivamente. Todos os AcMos anti-LH-Eg reconheceram as frações 79-, 67- e 8-kDa do Ag LH-Eg e as de 24- e 16-kDa pelo AcMos anti-antígeno rAgB. No immunoblot, as amostras humanas reconheceram as frações 79-, 67-, 57-, 43-, 38-kDa e também as específicas (24-, 16- e 8-kDa) para o diagnóstico da hidatidose. As frações responsáveis pela reatividade cruzada foram 79-, 67- e 57-kDa. Nossos estudos mostraram que é necessária uma melhor abordagem incluindo em estudos futuros a obtenção de antígenos recombinantes, específicos de cada um dos parasitos.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*. *Taenia crassiceps*. Reatividade cruzada. Anticorpos. Antígenos.

ABSTRACT

SILVA, F.É.V. **Specific and cross reactivity of *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps* antigens using samples from patients with hydatidosis and neurocysticercosis.** São Paulo, 2007. 89 pgs. Thesis for Master degree. College of Pharmaceutical Sciences College – University of São Paulo.

Studies to evaluate the reactivity of the hydatid liquid antigens of *Echinococcus granulosus* (Ag LH-Eg) and of the vesicular liquid antigens of *Taenia crassiceps* (Ag LV-Tcra) were conducted using anti-*E. granulosus* and anti-*T. crassiceps* monoclonal antibodies (MoAbs), and human sample, through SDS-PAGE, ELISA and immunoblot tests. The SDS-PAGE showed a complex standard of proteins from 97- to 8-kDa of the LH-Eg and from 97- to 14-kDa of the LV-Tcra. The characterization of antigens with the MoAbs through ELISA showed that all the anti-*E. granulosus* MoAbs reacted with the LH-Eg antigen and one of them cross-reacted with the LV-Tcra antigen. One of the two anti-*T. crassiceps* MoAb also reacted with the LH-Eg antigen. The reactivity of the LH-Eg with human samples presented better results with the cut off value representing the mean value plus two standard deviations (M+2DP) and with a dilution of 1:250. The hydatidosis samples (Hi) showed maximum reactivity (100%) with this dilution. When evaluated by the ELISA-LH-Eg, the neurocysticercosis samples (NC) showed cross-reactivity of 66,5%, the taeniasis (T) showed 46%, the negative control (CN) of 4% and 84,5% for other parasitoses (OP). The NC samples, diluted at 1:50, showed 100% of reactivity in ELISA-LV-Tcra test with the TgRoc cut off value. Concerning the samples of hydatidosis, taeniasis, other parasitoses and the negative control, reactivity was 73,5; 61,5; 69 and 2%, respectively. All the anti-LH-Eg MoAbs recognized the fractions 79- and 67-kDa of the Ag LH-Eg and the 24- and 16-kDa through the rAgB anti-antigen MoAb. By immunoblot, the human samples recognized the fractions 79-, 67-, 57-, 43-, 38-kDa and also the specific ones (24-, 16- and 8-kDa) for diagnosing hydatidosis. The fractions, responsible for the cross-reactivity, were 79-, 67- and 57-kDa. Our study showed that further approaches are needed and should include the obtaining of recombinant antigens, specific for each parasite.

Key words: *Echinococcus granulosus*. *Taenia crassiceps*. Cross-reactivity. Antibodies. Antigens.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo biológico do <i>Echinococcus granulosus</i>	21
Figura 2 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulato de sódio (SDS-PAGE) 5-20% dos antígenos de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> em condições redutoras (A) e não redutoras (B) e 15% de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> em condições redutoras (7,0 µg/mm) (C). Aplicado 5; 7 e 10 µg/mm em 1, 2 e 3, respectivamente. P = padrão de massa molecular (kiloDalton)	44
Figura 3 -	ELISA utilizando antígeno de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> com amostras de pacientes com hidatidose (Hi) (n=49), amostras controle negativo (CN) (n=100), neurocisticercose (NC) (n=15), teníase (T) (n=13) e outras parasitoses (OP) (n=13), diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500. Cut off estudados: (1) TgRoc, (2) MxS e (3) M+2DP.....	47
Figura 4 -	ELISA utilizando antígeno de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> com amostras de pacientes com neurocisticercose (NC) (n=15), amostras controle negativo (CN) (n=100), hidatidose (Hi) (n=49), teníase (T) (n=13) e outras parasitoses (OP) (n=13), diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500. Cut off estudados: (1) TgRoc, (2) MxS e (3) M+2DP.....	49
Figura 5 -	Immunoblot (SDS-PAGE: 5-20%) dos antígenos de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> (Ag LH-Eg) (10,0 µg/mm) e de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> (Ag LV-Tcra) (7,0 µg/mm) utilizando diferentes AcMos. B = controle do conjugado	52
Figura 6 -	Immunoblot (SDS-PAGE 5-20%) utilizando antígeno de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> (Ag LH-Eg) (10,0 µg/mm) com algumas amostras de pacientes com hidatidose (Hi), neurocisticercose (NC), teníase (T), outras	

	parasitoses (OP) e controle negativo (CN). Padrão de massa molecular (P)	53
Figura 7 -	Frequência de reatividade das frações do antígeno de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> no immunoblot em diferentes amostras de soros. Hidatidose (Hi) (n=49), neurocisticercose (NC) (n=15), teníase (T) (n=13), outras parasitoses (OP) (n=13) e controle negativo (CN) (n=100)	54
Figura 8 -	Immunoblot (SDS-PAGE: 5-20%) utilizando antígeno de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> (Ag LV-Tcra) (7,0 µg/mm) com algumas amostras de pacientes com neurocisticercose (NC), hidatidose (Hi), teníase (T), outras parasitoses (OP) e controle negativo (CN). Padrão de massa molecular (P).....	55
Figura 9 -	Frequência de reatividade das frações do antígeno de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> no immunoblot em diferentes amostras de soros. Neurocisticercose (NC) (n=15), hidatidose (Hi) (n=49), teníase (T) (n=13), outras parasitoses (OP) (n=13) e controle negativo (CN) (n=100)	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos monoclonais (AcMos) anti- <i>E. granulosus</i> e anti- <i>T. crassiceps</i> obtidos, suas reatividades por ELISA com os antígenos de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> (LH-Eg) e de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> (LV-Tcra)	45
Tabela 2 -	Reatividade (%) por ELISA do antígeno de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> frente às diferentes diluições de amostras de soros de diferentes patologias	48
Tabela 3 -	Reatividade (%) por ELISA do antígeno de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> frente às diferentes diluições de amostras de soros de diferentes patologias	50
Tabela 4 -	Reatividade dos anticorpos monoclonais anti- <i>E. granulosus</i> e anti- <i>T. crassiceps</i> para os antígenos de líquido hidático de <i>E. granulosus</i> (LH-Eg) e de líquido vesicular de <i>T. crassiceps</i> (LV-Tcra) pelo teste immunoblot	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACF	Adjuvante completo de Freund
AcMo	Anticorpo monoclonal
Ag	Antígeno
AgB	Antígeno B de <i>Echinococcus granulosus</i>
Ag5	Antígeno 5 de <i>Echinococcus granulosus</i>
AIF	Adjuvante incompleto de Freund
Anti-ES-Tcra	Anticorpo anti-antígeno de excreção e secreção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
Anti- <i>E. granulosus</i>	Anticorpo anti- <i>Echinococcus granulosus</i>
Anti-LH-Eg	Anticorpo anti-líquido hidático de <i>Echinococcus granulosus</i>
Anti-LV-Tcra	Anticorpo anti-líquido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>
Anti-rAgB	Anticorpo anti-antígeno recombinante B de <i>Echinococcus granulosus</i>
Anti- <i>T. crassiceps</i> / Anti-Tcra	Anticorpo anti- <i>Taenia crassiceps</i>
CN	Amostras de soro controle negativo
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES-Tcra	Antígeno de excreção e secreção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
Hi	Amostras de soro de pacientes com hidatidose
IPTG	Tio β -galactopiranosídeos de isopropila

LH-Eg	Antígeno de líquido hidático de <i>Echinococcus granulosus</i>
LV-Tcra	Antígeno de líquido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>
M+2DP	Média das absorbâncias das amostras controle negativo mais dois desvios-padrão
MxS	Máxima sensibilidade
n	Número de amostras
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
NC	Amostras de soros de pacientes com neurocisticercose
NIBSC	National Institute of Biological Standards and Controls
OIE	Office International des Epizooties
OP	Amostras de soros de pacientes com outras parasitoses
OPD	Orto-fenilenodiamina
ORF	Ontary Research Foundation
PAIR	Punção-Aspiração-Injeção-Respiração
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
rAgB	Antígeno recombinante B de <i>Echinococcus granulosus</i>
rEpC1	Antígeno recombinante de <i>Echinococcus granulosus</i>
Rf	Relative front
Roc	Receiver Operating Characteristic
RSSH	Rede Sul Americana de Sorologia Hidatídica

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Solução S	Solução Salina 0,15 M
Solução S-T	Solução salina 0,15 M contendo 0,05% de Tween 20
SSTF	Solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2 (Na_2HPO_4 0,0075 M, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,025 M e NaCl 0,14 M)
SSTF-T	SSTF contendo 0,05% de Tween 20
T	Amostras de soros de pacientes com teníase
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
TMB	3, 3', 5, 6' – tetrametilbenzidine
T/S	Tris-hidroximetilaminoetano 0,01 M e NaCl 0,15 M pH 7,4
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	ASPECTOS GERAIS	20
1.2	DIAGNÓSTICO	26
2	OBJETIVOS	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	PARASITOS	33
3.1.1	<i>Echinococcus granulosus</i>	33
3.1.2	<i>Taenia crassiceps</i>	35
3.2	ANTICORPOS MONOCLONAIS (AcMos) anti- <i>E. granulosus</i> E anti- <i>T. crassiceps</i>	36
3.3	AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS	37
3.4	ELISA PARA DETERMINAR OS ISÓTIPOS DOS AcMos anti- <i>E. granulosus</i>	38
3.5	ELISA	39
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra	41
3.6.1	SDS-PAGE	41
3.7	IMMUNOBLOT UTILIZANDO ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra, AcMos anti- <i>E. granulosus</i> , anti- <i>T. crassiceps</i> E SOROS HUMANOS	42
4	RESULTADOS	44
4.1	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO – SDS-PAGE..	44
4.2	ELISA UTILIZANDO AcMos anti- <i>E. granulosus</i> E anti- <i>T.</i> <i>crassiceps</i>	45
4.3	TESTE ELISA UTILIZANDO ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra E SOROS HUMANOS	46

4.4	REATIVIDADE DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS ESPECÍFICAS DOS ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra E DE REATIVIDADE CRUZADA ENTRE AS DIFERENTES AMOSTRAS DOS DIFERENTES GRUPOS	51
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

O complexo equinococose/hidatidose é reconhecido desde a antigüidade. Hipócrates já havia relatado que cistos hidáticos em humanos eclodiam na cavidade abdominal com aspecto de “tumores cheios de água”. Desde então, o complexo equinococose/hidatidose tem sido descrito em diversas pesquisas, não somente como infecção e doença, como também por ser um dos mais caros no tratamento e prevenção em termos de Saúde Pública (WHO/OIE, 2001).

A infecção por cistos de *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) é considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade em humanos em todo o mundo. Infecções zoonóticas por *E. granulosus* não estão somente em países subdesenvolvidos, como também em países industrializados, particularmente em áreas rurais ou dentro de grupos imigrantes de áreas endêmicas (RAETHER; HÄNEL, 2003).

No ciclo de vida do *E. granulosus*, os hospedeiros definitivos são os cães e outros canídeos e os hospedeiros intermediários, os ungulados (ovelhas, bois, porcos, cavalos) (ECKERT; DEPLAZES, 2004) (Figura 1). Acidentalmente, o ser humano pode se infectar com ovos e apresentar hidatidose.

A equinococose é uma zoonose com distribuição mundial e de grande impacto na saúde de humanos e animais, causando graves consequências sócio-econômicas nas áreas endêmicas e em países ou regiões onde há migração de pessoas e animais domésticos infectados, sendo assim o *E. granulosus* é considerada a espécie mais relevante (CARMENA et al., 2005; KHABIRI et al., 2006; ZHANG; McMANUS, 2006).

Os cistos de *E. granulosus* são uniloculares, de forma subesférica e repleto de líquido hidático, podendo atingir 4 a 10 cm de diâmetro (AL-YAMAN; KNOBLOCH, 1989; McVIE et al., 1997; ECKERT; DEPLAZES, 2004). O cisto consiste de uma membrana germinativa suportada externamente por uma camada laminada acelular, a qual é envolvida por uma camada adventícia produzida pelo hospedeiro (SARAIVA, 2001). Na membrana germinativa, formam-se as cápsulas prolíferas, onde se originam os metacestóides (ECKERT; DEPLAZES, 2004).

Nos animais, a hidatidose não produz nenhum sinal clínico e é normalmente descoberta durante a inspeção da carne nos abatedouros, onde as vísceras infectadas são condenadas e muitas vezes são fornecidas aos cães (ECKERT; DEPLAZES, 2004; CARLOS et al., 2006).

A fase inicial da infecção primária no homem é sempre assintomática. Os cistos tipicamente são pequenos, bem encapsulados, não-progressivos ou calcificados e não induzem maiores complicações e o paciente pode permanecer assintomático por anos ou permanentemente (ECKERT; DEPLAZES, 2004; CARLOS et al., 2006). A indução da morbidade depende do número de cistos, tamanho, localização, órgão envolvido, pressão sobre tecidos e estruturas dos mecanismos de defesa do paciente infectado (ECKERT; DEPLAZES, 2004; ZHANG; McMANUS, 2006). Os sintomas clínicos refletem a presença de um ou mais cistos. No humano, os sítios anatômicos mais comuns para o desenvolvimento de cistos são o fígado (70%) e os pulmões (20%), embora possam ser encontrados no pâncreas, cavidade intra-abdominal, rins, glândula adrenal, baço, ovário, cérebro, mediastino ou tecido subcutâneo com frequência entre 5 a 30% (YILDIRIM; ERKAN; VARDAR, 2006; ZHANG; McMANUS, 2006). Com o crescimento gradual dos cistos,

o parasito pode causar danos aos tecidos e órgãos, tornando-os disfuncionais na fase tardia da doença (ZHANG; McMANUS, 2006).

A intensidade da resposta imune em pacientes com hidatidose tem sido associada com a localização e condição dos cistos. Pacientes com cistos localizados no fígado produzem resposta imune mais intensa do que os pacientes com cistos localizados nos pulmões e os testes imunológicos são menos efetivos com cistos intactos e hialinos (SCHANTZ; SHANKS; WILSON, 1980; SBIHI et al., 2001; ECKERT; DEPLAZES, 2004).

O diâmetro do cisto hepático é em torno de 12 cm, causando freqüentes complicações como obstrução da árvore biliar, danos na confluência do ducto biliar e ruptura intrabiliar produzindo características clínicas como dor abdominal, colestase e dilatação dos ductos biliares, colecistite e formação de fístula. Quando o cisto está em um ou em ambos os pulmões, os sintomas comuns são febre, dor torácica, dispnéia e tosse crônica. O cisto pulmonar é freqüentemente associado com o cisto hepático (RAETHER; HÄNEL, 2003).

A hidatidose ocorre em populações pastoris por todo mundo, onde a presença de cães e gados, ovino e bovino, combinada com a condição higiênico-sanitária e a ignorância da população permitem a perpetuação do seu ciclo de vida (ARAMBULO III, 1997; CRAIG; ROGAN; CAMPOS-PONCE, 2003).

O principal fator da persistência da doença é a alimentação de cães com vísceras infectadas de ovinos e/ou bovinos. Quebrar o ciclo seria a principal medida de controle, porém isto requer conhecimento e educação sanitária. O controle da doença é dificultado por vários motivos, entre eles, alto nível de infecção em áreas endêmicas, falta de recursos, dificuldade no diagnóstico precoce, pouco

conhecimento público, cães vadios sem nenhum controle e falta de inspeção ou abate ilegal de animais infectados (CARLOS et al., 2006).

Devido à falta de dados bem documentados e representativos em muitos países, o quadro global da situação atual é considerado incompleto, no entanto, os dados disponíveis indicam que o complexo equinococose/hidatidose continua sendo um problema significativo de saúde pública em numerosos países (WHO/OIE, 2001; ECKERT; DEPLAZES, 2004).

O *E. granulosus* ocorre em todos os continentes, incluindo o Círculo Polar, o temperado, o subtropical e as zonas tropicais. Altas prevalências são encontradas em partes da Eurásia (Região do Mediterrâneo, Federação Rússia e Estados Independentes e China), África (Regiões norte e leste), Austrália e na América Latina. Na América Latina, as regiões mais afetadas são Argentina (Patagônia, Pampas e litoral), Bolívia (partes do sul e do oeste), Brasil (Rio Grande do Sul), Chile (regiões do sul, central e dos Vales e a Antártica Chilena), Peru (Montanhas central e do sul) e todo o Uruguai (ARAMBULO III; 1997; WHO/OIE, 2001; ECKERT; DEPLAZES, 2004).

No Brasil, a região sul é considerada endêmica no Rio Grande do Sul, onde a hidatidose é um sério problema de saúde pública, especialmente nos municípios que fazem fronteira com o Uruguai e Argentina, devido à presença importante do rebanho ovino na região (KLOETZEL; PEREIRA, 1992; ARAMBULO III, 1997). No Rio Grande do Sul, no período de 1973-1984, foi registrado um total de 470 casos humanos, sendo 241 do sexo feminino e 229 do masculino (ARAMBULO III, 1997; WHO/OIE, 2001) e no período de 1980-1991, foram documentados 600 casos humanos, com uma média de 50 casos por ano e incidência de 0,54/100.000 (WHO/OIE, 2001). Acomete maiores de 20 anos, cuja ocupação normalmente está

associada ao trabalho agrícola ou pastoril (CRAIG; ROGAN; CAMPOS-PONCE, 2003; CARLOS et al., 2006).

Para o tratamento da hidatidose, há várias opções, como cirurgia, a técnica de “Punção-Aspiração-Injeção-Respiração” (PAIR), quimioterapia e acompanhamento, dependendo de cada caso. A cirurgia é indicada para grandes cistos com várias ramificações no fígado ou quando se localiza no pulmão, rim, cérebro, osso e outros órgãos. A técnica “PAIR” e a quimioterapia são tratamentos alternativos mais indicados para pacientes que não podem ser operados e que apresentam cisto hepático na fase inicial e com múltiplos cistos em dois ou mais órgãos. A quimioterapia é feita utilizando albendazol ou mebendazol. O acompanhamento é indicado para cistos homogeneamente calcificados (WHO/OIE, 2001; ECKERT; DEPLAZES, 2004).

Programas de controle da hidatidose mostram que a prevenção da transmissão para ambos os hospedeiros pode reduzir ou ainda eliminar a infecção em humanos e em animais domésticos. Um método de controle adicional seria a vacina para uso em cães, sendo uma ferramenta para o controle da hidatidose. Estudos realizados com ovinos (LIGHTOWLERS et al., 1996; HEATH; JENSEN; LIGHTOWLERS, 2003) e com a vacina baseada em clones de antígenos recombinantes derivados de ovos do *E. granulosus* demonstrou alto nível de proteção (95-100%) frente à infecção experimental ou naturalmente adquirida (HEATH; JENSEN; LIGHTOWLERS, 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006; CARLOS et al., 2006). Apesar de descrita há uma década, ela tem de ser ainda introduzida como parte do programa de controle em áreas endêmicas da hidatidose tendo suporte governamental (ZHANG; McMANUS, 2006).

1.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce é importante porque permite estabelecer a intervenção, podendo reduzir a morbidade, melhorando a qualidade na direção e tratamento da doença.

O diagnóstico da hidatidose no homem é definido pela presença de estruturas de cistos por métodos de imagem, como radiografia, ultra-sonografia, tomografia axial computadorizada e ressonância nuclear magnética (ECKERT; DEPLAZES, 2004; ZHANG; McMANUS, 2006).

Devido à variabilidade de sinais e sintomas da doença, o diagnóstico clínico é freqüentemente dificultado e requer combinação entre técnicas de imagens e métodos imunodiagnósticos, como ensaios imunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA) e immunoblot (ORTONA et al., 2003; CARMENA et al., 2005).

A reação de fixação do complemento foi o primeiro teste imunológico a ser utilizado no sorodiagnóstico da hidatidose. Desde então, um amplo número de testes imunológicos têm sido desenvolvidos para a detecção de antígenos e anticorpos anti-*E. granulosus*. Os testes sorológicos baseados na pesquisa de anticorpos anti-*E. granulosus*, utilizando antígenos brutos, incluem: hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, imunoeletroforese, radioimunensaio e ELISA e mais recentemente, o immunoblot como teste confirmatório (ECKERT; DEPLAZES, 2004; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006). O teste sorológico mais utilizado para pesquisa de antígenos de *E. granulosus* utilizando soro é o ELISA (PARIJA et al., 1998; ORTONA et al., 2003; ZHANG; LI; McMANUS, 2003; ECKERT; DEPLAZES, 2004; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

Os testes sorológicos são úteis para o diagnóstico da hidatidose em populações de áreas onde a doença é endêmica, devido ao seu baixo custo e fácil realização, já que as técnicas radiológicas são de alto custo ou não estão disponíveis em muitas áreas altamente endêmicas (ZHANG; McMANUS, 2006). As técnicas para detecção de anticorpos em pacientes com hidatidose têm mostrado considerada variação entre os laboratórios como grandes proporções de falso-negativos pela falta de sensibilidade e de falso-positivos pela falta de especificidade (SHEPHERD; McMANUS, 1987; SBIHI et al., 2001).

Apesar do desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas como o immunoblot, o imunodiagnóstico da hidatidose ainda permanece uma tarefa muito complexa (ORTONA et al., 2003). O ELISA é considerado um método eficaz para pesquisa de anticorpos nos pacientes por ser altamente sensível. No entanto, pode apresentar pouca eficiência, dependendo da amostra utilizada, por exemplo, de pacientes com ou sem confirmação cirúrgica da infecção, localização não habitual ou calcificação dos cistos e da qualidade do extrato antigênico. Na pesquisa de anticorpos utilizando antígenos brutos ou parcialmente purificados, as técnicas apresentam problemas devido à baixa concentração dos antígenos específicos e reatividade cruzada com amostras de pacientes acometidos com outras parasitoses, afetando a sensibilidade e especificidade do teste e prejudicando a padronização dos métodos (VIRGINIO et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

O antígeno empregado nas provas imunodiagnósticas é o líquido hidático, que é uma complexa mistura de glico e lipoproteínas, carboidratos e sais. Alguns desses componentes vêm do hospedeiro, principalmente albumina e imunoglobulinas, os outros componentes são resultados da atividade metabólica do metacestóide. O líquido hidático é considerado a principal fonte antigênica para o

imunodiagnóstico da hidatidose por ser altamente imunogênico (SARAIVA, 2001). Na rotina diagnóstica, o antígeno de líquido hidático bruto apresenta sensibilidade variando de 75 a 95%, porém sua especificidade é freqüentemente insatisfatória devido às reações cruzadas com soros de pacientes infectados com outros cestódeos, nematódeos e trematódeos (ISHIDA et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005; CARMENA ; BENITO; ERASO, 2006).

Para o diagnóstico da hidatidose, a reatividade cruzada é um problema particular do antígeno de *E. granulosus* e conseqüentemente os resultados falso-positivos são constantemente observados (SCHANTZ; SHANKS; WILSON, 1980; McVIE et al., 1997; VIRGÍNIO et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006). O antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* (LH-Eg) bruto é especialmente recomendado para estudos soroepidemiológicos pela WHO/OIE (2001). Na tentativa de reduzir os resultados falso-positivos têm sido utilizados antígenos purificados como os antígenos B (AgB) e 5 (Ag5), que são os componentes mais abundantes e relevantes do fluido hidático (RIGANO et al., 2001; LI et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

A reatividade cruzada com soros de pacientes infectados com outros helmintos, principalmente as *Taenias*, ocorre por serem filogeneticamente semelhantes e compartilhar componentes antigênicos em comum (ISHIDA et al., 2003).

O AgB (ORIOL et al., 1971) é uma fração altamente imunogênica em infecções humanas. Esse antígeno é encontrado em mais de 10% do total do conteúdo do fluido hidático, é uma lipoproteína termoestável de 120-160 kDa que produz subunidades de 8 ou 12, 16, 20 ou 24 e 32 kDa em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras ou não

(RIGANO et al., 2001; CARMENA et al., 2005; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006; MAMUTI et al., 2006). Ele tem sido caracterizado como um inibidor de protease que impede a quimiotaxia de neutrófilos (SHEPHERD et al., 1991) e inibindo a produção da resposta imune T_H2 (RIGANO et al., 2001) e induzindo a apoptose de células em pacientes com a doença ativa (RIGANO et al., 2002). Estudos imuno-histológicos têm mostrado que esse antígeno está localizado no tegumento da protoescólex e membrana germinal do metacéstóide e, portanto, é secretado dentro do fluido do cisto (RIGANO et al., 2001).

O Ag5 (CAPRON; VERNES; BIGUET, 1967) é uma proteína termolábil e altamente imunogênica composta de proteínas 57 e 67 kDa que em condições redutoras, dissocia-se em subunidades de 37, 38 e 22-24 kDa (PORETTI et al., 1999; LORENZO et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006). Historicamente, esse antígeno é um dos mais utilizados no imunodiagnóstico da hidatidose por precipitar com anticorpos presentes em amostras de pacientes com hidatidose, formando assim linhas de precipitação (arco 5) em técnicas como imunoeletoforese ou similares (ZHANG; LI; McMANUS, 2003). Trabalhos iniciais sugeriram esse antígeno como sendo altamente específico no diagnóstico da infecção por *E. granulosus*. No entanto, estudos subseqüentes mostraram que o Ag5 tem reatividade cruzada com anticorpos de pacientes com outros cestódeos, trematódeos e nematódeos (PORETTI et al., 1999; ZHANG; LI; McMANUS, 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006). O papel biológico dessa molécula é pouco conhecido, embora sua elevada concentração no fluido hidático sugira uma relevante função no desenvolvimento do metacéstóide (CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

Embora as frações antigênicas AgB e Ag5 tenham se mostrado valiosas no diagnóstico, existem dificuldades em relação à falta de sensibilidade e especificidade, levando a problemas com a padronização dos ensaios. As reações cruzadas desses antígenos são mais observadas em pacientes acometidos com outros cestódeos. Além disso, os métodos tradicionais utilizados para sua purificação limitam a pureza desses antígenos, o que tem prejudicado seu uso no diagnóstico (ZHANG; LI; McMANUS, 2003).

Componentes antigênicos do *E. granulosus* podem ser isolados e purificados através da aplicação de uma variedade de métodos, como cromatografia por troca iônica, focalização isoeletrica, cromatografia de afinidade e anticorpo monoclonal, que é um instrumento útil na análise de antígenos parasitários. A produção de anticorpos monoclonais para antígenos específicos no diagnóstico da hidatidose pode favorecer a obtenção de frações antigênicas que sejam mais eficientes e melhorar o diagnóstico dessa infecção em homens e animais (LIU; RICKARD; LIGHTOWLERS, 1992; ZHANG; LI; McMANUS, 2003).

A utilização de técnicas de biologia molecular tem permitido obter uma considerável gama de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos que são promissores para o diagnóstico precoce da hidatidose em humanos, bem como podem melhorar a interpretação do imunoensaio (VIRGINIO et al., 2003; LI et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

As técnicas de DNA recombinante podem ser extremamente úteis na produção de antígenos com qualidade e quantidades adequadas, embora ainda estejam em fase de desenvolvimento (HEATH; JENSEN; LIGHTOWLERS, 2003; LI et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2006).

Apesar de todos os avanços, não existe atualmente uma técnica padronizada que reúna elevadas sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da hidatidose (CARMENA; BENITO; ERASO, 2007), sendo o líquido hidático de *E. granulosus* a principal fonte de obtenção do antígeno para o diagnóstico da doença.

Um problema no diagnóstico da hidatidose é a dificuldade de obtenção de animais infectados para retirada dos cistos. A precariedade no transporte, armazenamento e variabilidade de cistos não garantem homogeneidade ou quantidades adequadas para qualidades dos lotes produzidos, tornando inviáveis os procedimentos de purificação pelo baixo rendimento obtido. A possibilidade de um modelo experimental, de fácil manutenção em laboratório, como alternativa na obtenção de parasitos para o preparo de antígenos adequados seria muito interessante.

A reatividade cruzada observada entre soros de pacientes com hidatidose e soro imune de coelho anti-*E. granulosus* e antígenos de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*), bem como soro imune de coelhos anti-*T. crassiceps* e antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* (ISHIDA et al., 2003), abre a possibilidade de se utilizar o modelo experimental de *T. crassiceps* como alternativa de obtenção de antígeno heterólogo e o possível uso desse antígeno como fonte alternativa para o imunodiagnóstico da hidatidose (COLTORTI; CAMMARIERI, 1993; ISHIDA et al., 2003). No entanto, são necessários maiores estudos objetivando a caracterização dos antígenos para identificar quais são as frações antigênicas responsáveis pelas reações específicas de cada espécie com o propósito de selecionar e purificar aqueles peptídeos imunodominantes específicos, que são comuns ao líquido hidático e úteis para o diagnóstico da hidatidose, mas que não mostrem importante reatividade com soros de cisticercose.

2 OBJETIVOS

Como contribuição aos estudos da hidatidose pela sua gravidade e dificuldade no imunodiagnóstico, principalmente pelas reações cruzadas com outras *Taenias*, o objetivo desse trabalho foi avaliar a reatividade de antígenos de líquido hidático da forma larvária de *E. granulosus* e de líquido vesicular de cisticerco de *T. crassiceps*.

Os objetivos específicos foram:

- ✓ Avaliação da reatividade dos antígenos no ELISA com soros homólogos e da reatividade cruzada com outros parasitos;
- ✓ Identificação das proteínas antigênicas responsáveis pelas reatividades específicas e cruzadas entre as duas espécies, utilizando anticorpos monoclonais e amostras humanas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARASITOS

Animais experimentais foram utilizados após parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP (51/2005), adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

3.1.1 *Echinococcus granulosus*

O líquido hidático de *E. granulosus* foi gentilmente cedido pela Dra. Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre-RS).

Resumidamente, a obtenção de *E. granulosus* foi realizada por aspiração com seringa e agulha dos cistos hidáticos de fígados e pulmões de ovinos parasitados obtidos em matadouros do Frigorífico Coperleu, Porto Alegre (RS). Quando foi realizado procedimento de retirada dos cistos em áreas com boas condições de higiene, o líquido hidático foi acondicionado em frascos dentro de caixas de isopor com gelo até o seu processamento. Nos casos onde a área não apresentou boas condições de higiene, as vísceras foram encaminhadas ao laboratório acondicionadas em caixas de isopor com gelo, mantendo-as refrigeradas e processadas imediatamente. Foi descartado o conteúdo dos cistos calcificados, infectados ou supurados, caracterizado pela aparência turva ou escassa quantidade de líquido apresentada. O conteúdo que se apresentou claro e sem nenhuma turvação foi recolhido em recipiente adequado e transferido para uma proveta para que houvesse decantação e assim sedimentação dos protoescólices e possíveis restos de membranas. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi aliquotado em frascos adequados e imediatamente congelados a -20°C (TIECHER, mensagem eletrônica, 2007).

O extrato antigênico de *E. granulosus* foi produzido de acordo com Maddison et al. (1989). Um volume de 250 mL de líquido hidático de *E. granulosus* foi aspirado de cistos férteis de ovelhas e centrifugado a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recentrifugado, dialisado contra água bidestilada, distribuído em um volume de 5 mL e liofilizado. Cada frasco foi ressuspensão em cerca de 1/50 do volume inicial com 110 µL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7,2 (SSTF), totalizando 5,5 mL de antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* (LH-Eg). Obtendo-se uma concentração protéica de 121,0 mg/mL (LOWRY et al., 1951).

O antígeno recombinante de *E. granulosus* foi gentilmente cedido pela Dra. Laura Kamenetzky do Laboratório de Parasitologia do Instituto Nacional de Microbiologia Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina.

Para a produção do antígeno recombinante B (rAgB), subclonaram-se regiões codificantes cEgB2G1v4 (proteína B2) em um vetor de expressão pET22 (Novagen), utilizando-se bactérias *Escherichia coli*, linhagem BL21 (DE3 codon plus (Stratgene)). Foram realizados cultivos de 1 litro induzido por 4 horas com Tio β-galactopiranosídeos de isopropila (IPTG) 0,1 mM. As bactérias foram coletadas e os extratos bacterianos foram sonicados e ressuspensos em solução tamponada contendo uréia 8 M, pH 8,0. Após centrifugação em alta velocidade, o sobrenadante foi aplicado em colunas de níquel-agarose (Bio-Rad).

Foram realizadas duas lavagens em tampão contendo uréia pH 8,0 e uma em pH 6,3. A eluição da proteína de interesse foi realizada em solução tamponada pH 4,5. A quantidade, qualidade e pureza das proteínas recombinantes foram determinadas mediante eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 20% sob condições redutoras e immunoblot com soro padrão anti-*Echinococcus* produzido pelo National Institute of Biological Standards

and Controls (NIBSC). A proteína B1 recombinante foi fornecida pela Rede Sul Americana de Sorologia Hidatídica (RSSH) (KAMENETZKY, mensagem eletrônica, 2007).

3.1.2 *Taenia crassiceps*

Os cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF - Ontario Research Foundation, Canadá (FREEMAN, 1962), foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Carlos Larralde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autonoma de México e vêm sendo mantidos desde 1990 por passagens intraperitoneais de 10 a 15 larvas jovens, a cada 90 dias, em camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, segundo Vaz et al. (1997a).

Foi utilizado o extrato antigênico de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) (BUENO et al., 2000).

Resumidamente, para obtenção do antígeno LV-Tcra, os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a 15.000 g, durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação foi retirado o sobrenadante e estocado. O sobrenadante foi reunido e submetido ao tratamento por ultra-som (Ultrasonic Power Unit – MSE, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1 mA e 20 kHz, em banho de gelo. A mistura foi centrifugada duas vezes a 10.000 g, durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante constituiu o extrato antigênico LV-Tcra, obtendo-se uma concentração protéica de 28,0 mg/mL. Ao antígeno obtido foi adicionado os inibidores de proteases PMSF (phenylmethylsulphonylfluoride) e Iodoacetamida na concentração final de 0,4 mM dividido em alíquotas e conservado a -20°C (LOWRY et al., 1951; VAZ et al., 1997b).

3.2 ANTICORPOS MONOCLONAIS (AcMos) anti-*E. granulosus* E anti-*T. crassiceps*

Foram obtidos sete AcMos anti-*E. granulosus*, sendo cinco anti-LH-Eg e dois anti-antígeno recombinante de *E. granulosus* (rAgB) segundo Espíndola et al. (2002).

Cinco camundongos BALB/c foram imunizados pela via subplantar com 20 µg dos antígenos LH-Eg ou rAgB solubilizados em 25 µL salina e emulsificados na mesma proporção em adjuvante completo de Freund (ACF). Após 15 dias, os animais receberam a mesma dose de antígenos preparados em adjuvante incompleto de Freund (AIF). Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico nos tempos zero, 8, 12, 19, 31 e 44 dias.

A determinação da cinética dos anticorpos nos soros dos camundongos para verificar a reatividade com os antígenos LH-Eg e recombinante de *E. granulosus* (rAgB) foi feita por ELISA.

Três dias após *booster* final, foram retirados os linfonodos e as células foram fundidas com mielomas SP2O utilizando polietilenoglicol (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A seleção dos clones foi iniciada dez dias após a fusão celular, quando os hibridomas já apresentavam bom crescimento celular.

Os hibridomas obtidos da fusão a partir de animais imunizados com os antígenos LH-Eg e rAgB que apresentaram reatividade por ELISA foram clonados por diluição limitante. De cada hibridoma clonado, o poço que apresentou a maior absorbância por ELISA foi selecionado para ser reclonado. As células selecionadas na reclonagem foram expandidas *in vitro* para armazenamento dos clones por congelamento e *in vivo* para obtenção de ascite.

O processo de purificação dos AcMos obtidos em ascite foi iniciado com tratamento do líquido ascítico para retirar os lipídeos, adicionando 20 µL de uma solução de sulfato de dextran a 10% e 100 µL de CaCl₂ a 1 M por mL de líquido ascítico, sob agitação por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5.000 g por 10 min e o sobrenadante dialisado contra tampão borato-salina (tampão borato: ácido bórico a 0,1 M, tetraborato de sódio a 0,1 M e cloreto de sódio a 1 M, pH 8,5 diluído 1:20 em NaCl a 0,15 M) por 48 horas. Os fluidos ascíticos deslipidados foram purificados por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna de Proteína A (Amershan Pharmacia biotech, Piscataway, N. J.).

Outros dois AcMos anti-*T. crassiceps*, um anti-LV-Tcra e um anti-excreção e secreção de *T. crassiceps* (ES-Tcra) foram obtidos anteriormente (ESPÍNDOLA et al., 2002) e utilizados nesses estudos.

3.3 AMOSTRAS DE SOROS HUMANOS

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, vigentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), após parecer favorável da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FCF/USP nº 188/2003, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (BRASIL, 1996).

Um total de 190 soros foi utilizado para o estudo da reatividade específica e cruzada entre *E. granulosus* e *T. crassiceps*.

Foram utilizadas 49 amostras de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial (ELISA e Imunofluorescência Indireta) (TIECHER, mensagem eletrônica, 2007) de hidatidose (Hi), gentilmente cedidas pela Dra. Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre, Rio Grande do Sul).

Foram utilizadas 15 amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) confirmadas por critérios clínicos, laboratoriais e por exames de imagem, cedidas pelo Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado e Prof. Dr. José Antônio Livramento - Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo - FMUSP e Prof. Dr. Osvaldo Massati Takaynagui - Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRPUSP.

Treze amostras de soros de pacientes com teníase (T) foram cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia – Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo.

Das 13 amostras de soros com outras parasitoses (OP) utilizadas, dez foram de pacientes com toxocaríase cedidas pela Dra. Guita Rubinsky Elephant, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. As outras 3 amostras foram de pacientes com *Ascaris lumbricoides* (uma amostra), *Strongyloides stercoralis* (uma amostra), *Schistosoma mansoni* (uma amostra) cedidas pela Dra. Márcia Ishida - Universidade Federal de Santa Catarina.

Os 100 soros utilizados como controle negativo (CN) foram cedidos pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF/USP, que faz parte da coleção de amostras do Departamento de Imunologia da FCF/USP.

3.4 ELISA PARA DETERMINAR OS ISÓTIPOS DOS AcMos anti-*E. granulosus*

Os isótipos dos AcMos foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas com 100 µL de AcMo anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM de camundongo (Sigma) diluídos a 1:1000 em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,05% de Tween 20 (SSTF-T) e incubadas durante 16 horas a 4°C. Na

seqüência, as placas foram lavadas com solução salina 0,15 M contendo Tween 20 a 0,05% e bloqueadas por 1 hora com 200 µL de leite molico 5%. Repetidas as lavagens, foram incubadas com 100 µL de sobrenadante de cultura. Após 1 hora a 37°C foram feitas novas lavagens e adicionado 100 µL do conjugado de anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:2000 em leite molico 1% preparado em SSTF-T.

Após a incubação de mais 1 hora a 37°C, novas lavagens foram feitas e a reação foi revelada com substrato preparado com 1 mL de H₂O₂ e 9 mL de uma solução contendo 3, 3', 5, 6' – tetrametilbenzidine (TMB) (Bio Rad). A leitura foi feita a 450 nm (Mouse monoclonal antibody isotyping reagents, Sigma).

3.5 ELISA

Condições ótimas foram analisadas previamente, variando as quantidades de antígeno e diluições de soro.

No ELISA com os antígenos LH-Eg e LV-Tcra, foram utilizados soros de pacientes com hidatidose, neurocisticercose, teníase, outras parasitoses e amostras controle negativo. Inicialmente, as placas de fundo chato Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) com 96 poços, foram sensibilizadas com 100 µL por cavidade com 1,0 µg de LH-Eg ou 0,05 µg de LV-Tcra diluídos tampão carbonato/bicarbonato 0,5 M, pH 9,6, e então incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina (solução S) 0,15 M contendo Tween 20 (Merck®, Schudat, Munich, Germany) a 0,05% (solução S-T) em lavadora automática (Diagnostics Pasteur-LP 35, Straburg-Schiltigheim, France). Em seguida, seus sítios livres foram bloqueados com 200 µL de solução de leite desnatado (Molico, Araçatuba, SP, Brasil) a 5% preparado em

SSTF-T por 1 hora a 37°C. Foram repetidas as lavagens e, então, adicionados 100 µL por poço de soro humano diluído a 1:50, 1:250 e 1:500 em leite 1% preparado em SSTF-T ou AcMo 1:250, 1:500 e 1:1000 e incubadas por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens com solução S-T, foram acrescentados 100 µL por poço dos conjugados anti-IgG humana-peroxidase (Biolab Diagnóstica SA, Jacarepaguá, RJ, Brasil) ou conjugado anti-camundongo-peroxidase (Sigma Chem. Co., EUA), diluídos respectivamente a 1:3000 e 1:2000 em leite 1% preparado em SSTF-T. As placas foram incubadas com 100 µL por poço de substrato constituído de orto-fenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co EUA) (1mg/mL) e H₂O₂ (Merck, Alemanha) (1µL/mL) diluídos em tampão citrato/fosfato por 10 minutos a 37°C, e em seguida foram lavadas. A reação enzimática foi interrompida com 100 µL por poço de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da reação foi feita em espectrofotômetro (SLT Spectra - SLT Labinstruments AS-5082, Áustria) a 492 nm.

Em cada teste foi feito um “branco” da reação que se constitui da reação sem a presença da amostra, para verificar a reatividade de fundo (*back-ground*) da reação.

Para avaliar a reatividade dos antígenos LH-Eg e LV-Tcra foram propostos três diferentes formas de calcular o *cut off*, considerando a Curva Roc (Receiver Operating Characteristic), Média das absorbâncias das amostras CN mais dois desvios-padrão dessas absorbâncias (M+2DP) e Máxima sensibilidade (MxS).

A Curva Roc é definida como a descrição gráfica do desempenho de um teste representado pela relação entre a taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) e taxa de falso-positivos (especificidade). A curva representa a precisão intrínseca do teste e é ideal para a comparação de testes, minimizando ao máximo custos de eventuais falsos resultados (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995). A Média das

absorbâncias das amostras CN mais dois desvios-padrão dessas absorbâncias (M+2DP) e a Máxima sensibilidade (MxS) definida para minimizar a presença de resultados falso-negativos, realizando uma triagem das amostras utilizadas.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra

3.6.1 SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi executada para caracterizar a composição peptídica dos extratos antigênicos bem como para execução do imunoblot.

O antígeno LH-Eg foi tratado ou não com 5% de 2-mercaptoetanol, aquecidos por 5 minutos a 100° C e aplicados na concentração de 10,0 µg/mm em sistema descontínuo 5 - 20%. O antígeno LV-Tcra aplicado na concentração 7,0 µg/mm sob condições não redutoras em gel de empilhamento 5% e corrida 15% (LAEMMLI, 1970), em amperagem constante 20 mA/placa. Foi utilizado padrão de massa molecular de 14,4- a 94-kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia). A corrida eletroforética (BioRad Laboratories Inc. Califórnia. EUA) foi realizada a 60 V até a passagem da amostra do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 150 V, até a chegada do marcador azul de bromofenol (Pharmacia Biotech, Suíça) no final do gel. O gel foi corado por Comassie Blue ou transferido para membrana de nitrocelulose 0,2 µ (Milipore, USA). A transferência foi realizada em sistema úmido utilizando cuba eletroforética (TE 42 Transphor Unit, Amershan Pharmacia Biotech, New Jersey, USA) a 4°C durante 16 horas a 50 V. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau-S 0,5% (Serva Feinbiochemical, GmbH e Co. KG, Alemanha) e descorada com água destilada para a retirada do excesso de corante e armazenada entre papéis de filtro a 4°C.

3.7 IMMUNOBLOT UTILIZANDO ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra, AcMos anti-*E. granulosus*, anti-*T. crassiceps* E SOROS HUMANOS

Para o estudo da reatividade dos anticorpos anti-LH-Eg, anti-recombinante de *E. granulosus*, anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra foi realizado o immunoblot utilizando antígenos LH-Eg e LV-Tcra e soros de pacientes com hidatidose, neurocisticercose, teníase, outras parasitoses e amostras controle negativo. Foi utilizada a técnica de immunoblot segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979), modificada por Espíndola (1999).

No immunoblot com AcMos e antígenos LH-Eg e LV-Tcra, foram ensaiados 5 AcMos anti-LH-Eg, 2 anti-rAgB de *E. granulosus*, um anti-LV-Tcra e um anti-ES-Tca, diluídos a 1:200 em leite molico 1% preparado em SSTF-T.

As membranas obtidas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e, sob agitação contínua, foram lavadas cinco vezes de 5 minutos com SSTF-T e bloqueadas por 2 horas com leite desnatado molico a 5% diluído em SSTF-T por duas horas em temperatura ambiente. Novas lavagens foram feitas e em seguida as tiras foram incubadas com 800 µL de amostras de soros ou AcMos diluídos a 1:200 em leite molico 1% preparado em SSTF-T.

Após incubação durante 15 a 18 horas a 4°C sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens. Foi adicionado 800 µL do conjugado anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Sigma Chemical CO. Cambridge Biotech corporation, Raritan, N. J., USA) ou anti-IgG de camundongo-fosfatase alcalina (Bio Rad Laboratories, Inc.), diluídos a 1:1000 ou a 1:2000, respectivamente, em leite molico 1%, à temperatura ambiente. A reação foi incubada por 1 hora. Após 3 lavagens em SSTF-T e a última em Tris-salina (T/S; tris-hidroximetilaminoetano 0,01 M e NaCl 0,15 M pH 7,4), foi adicionado 800 µL do tampão substrato preparado com 3 mg/mL

de 4-cloro-1-naftol (Sigma Chem. Co.) dissolvido em metanol e então diluído em 5 mL de T/S contendo 5 μ L de H₂O₂. No immunoblot utilizando AcMos anti-IgG-camundongo, a última lavagem foi feita com tampão bicarbonato de sódio/MgCl₂ 2M, e em seguida foi adicionado 800 μ L do substrato preparado com nitroblue tetrazolium (Sigma) e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (NBT/BCIP) (Sigma). A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água destilada.

Os cálculos de mobilidade relativa (*relative front* - Rf) e massa molecular foram calculados segundo Lambin et al. (1976).

4 RESULTADOS

4.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO DODECIL SULFATO DE SÓDIO - SDS-PAGE

A Figura 2 apresenta o perfil eletroforético dos antígenos LH-Eg e LV-Tcra obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio corados por Coomassie Blue.

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 5-20% dos antígenos de líquido hidático de *E. granulosus* em condições redutoras (A) e não redutoras (B) e 15% de líquido vesicular de *T. crassiceps* em condições redutoras (7,0 µg/mm) (C). Aplicado 5; 7 e 10 µg/mm em 1, 2 e 3, respectivamente. P = padrão de massa molecular (kiloDalton).

No SDS-PAGE do LH-Eg, pode-se observar que, tanto em condições redutoras como não redutoras, o padrão dos peptídeos foi semelhante, sendo o antígeno constituído de diferentes frações de 79-; 67-; 57-; 30-; 28-; 24-; 20-; 16- e 8-kDa.

As proteínas recombinantes de *E. granulosus* identificadas por SDS-PAGE a 20% quando coradas por Coomassie Blue foram 120-; 100-; 55-; 38-; 29-; 20- e 6-kDa (KAMENETZKY, mensagem eletrônica, 2007).

O SDS-PAGE do antígeno LV-Tcra apresentou várias frações, variando de 94- a 14-kDa, com predomínio de frações abaixo de 20-kDa (Figura 2).

4.2 ELISA UTILIZANDO AcMos anti-*E. granulosus* E anti-*T. crassiceps*

Os AcMos anti-LH-Eg e anti-LV-Tcra são do isótipo IgG1. Os AcMos anti-antígeno recombinante de *E. granulosus* são do tipo IgG2a e o anti-ES-Tcra é do tipo IgG2b (Mouse monoclonal antibody isotyping reagents, Sigma).

Na Tabela 1 estão apresentadas as reatividades dos AcMos anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* por ELISA utilizando os antígenos LH-Eg e LV-Tcra.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais (AcMos) anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* obtidos, suas reatividades por ELISA com os antígenos de líquido hidático de *E. granulosus* (LH-Eg) e de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra).

AcMo	Clone	Reatividade	
		LH-Eg	LV-Tcra
Anti-LH-Eg	k ₂ 12	(+)	(-)
	k ₂ 20	(+)	(-)
	k ₂ 24	(+)	(-)
	K ₂ H	(+)	(-)
	K ₂ J	(+)	(-)
Anti-rAgB	K ₂ 3	(+)	(-)
	K ₂ 7	(+)	(+)*
Anti-LV-Tcra	LV	(+)*	(+)
Anti-ES-Tcra	ES	(-)	(+)

(+) = absorbância ≥ 0,5

(+)* = 0,7

Todos os AcMos anti-*E. granulosus* foram reativos com antígeno LH-Eg nas três diluições (1:250, 1:500 e 1:1000), exceto K₂₃ e K₂₇ que reagiram apenas na diluição 1:250, considerando como reativos aqueles que apresentassem absorvância $\geq 0,5$. Em relação ao AcMo anti-LV-Tcra foi observada baixa reatividade para o Ag LH-Eg na diluição 1:250, absorvância de 0,70 e o AcMo anti-ES-Tcra apresentou absorvância de 0,48, considerada negativa para o teste.

Um AcMo-anti-rAgB (K₂₇) foi reativo nas diluições 1:250 e 1:500 quando ensaiado com antígeno LV-Tcra. Os AcMos anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra apresentaram uma intensa reatividade com o antígeno LV-Tcra nas três diluições, considerando reativos aqueles AcMos que apresentassem absorvância $\geq 0,5$.

4.3 TESTE ELISA UTILIZANDO ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra E SOROS HUMANOS

Na Figura 3 estão expressos os resultados das absorvâncias do ELISA utilizando antígeno LH-Eg e amostras de pacientes com hidatidose, controle negativo, neurocisticercose, teníase e outras parasitoses. São apresentados também os 3 *cut off* calculados para cada diluição ensaiada.

FIGURA 3 – ELISA utilizando antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* com amostras de pacientes com hidatidose (Hi) (n=49), amostras controle negativo (CN) (n=100), neurocisticercose (NC) (n=15), teníase (T) (n=13) e outras parasitoses (OP) (n=13), diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500. Cut off estudados: (1) TgRoc, (2) MxS e (3) M+2DP.

Resumidamente os resultados do ELISA-LH-Eg e amostras de soros humanos diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500 estão expressos na Tabela 2. Melhores resultados foram obtidos utilizando o *cut off* por M+2DP (absorbância 0,7), na diluição de 1:250.

Tabela 2 – Reatividade (%) por ELISA do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* frente às diferentes diluições de amostras de soros de diferentes patologias.

Grupo (nº de amostras)	Diluição Soros	TgRoc	<i>Cut off</i>	
			M+2DP	MxS
Hi (49)	1:50	96	100	100
	1:250	96	100	100
	1:500	94	94	100
CN (100)	1:50	3	6	5
	1:250	4	4	5
	1:500	6	5	10
NC (15)	1:50	66,5	93	93
	1:250	46,5	66,5	60
	1:500	26,50	26,50	33
T (13)	1:50	54	54	54
	1:250	46	46	46
	1:500	46	46	54
OP (13)	1:50	77	84,5	84,5
	1:250	77	84,5	77
	1:500	77	77	77

Amostras Hi = hidatidose Amostras NC = neurocisticercose Amostras T = teníase

Amostras CN = controle negativo Amostras OP = outras parasitoses

TgRoc = Curva Receiver Operating Characteristic MxS = Máxima sensibilidade

M+2DP = Média das absorbâncias das amostras CN mais dois desvios-padrão

Na Figura 4 estão expressos os resultados das absorbâncias do ELISA utilizando antígeno LV-Tcra e 15 amostras de pacientes com neurocisticercose (NC), 100 de amostras controle negativo (CN), 49 com hidatidose (Hi), 13 com teníase (T) e 13 com outras parasitoses (OP).

FIGURA 4 – ELISA utilizando antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* com amostras de pacientes com neurocisticercose (NC) (n=15), amostras controle negativo (CN) (n=100), hidatidose (Hi) (n=49), teníase (T) (n=13) e outras parasitoses (OP) (n=13), diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500. *Cut off* estudados: (1) TgRoc, (2) MxS e (3) M+2DP.

Na Tabela 3 estão demonstrados os valores de reatividade obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos anti-LV-Tcra em amostras de soros humanos diluídas a 1:50, 1:250 e 1:500, utilizando o antígeno LV-Tcra. Melhores resultados foram obtidos utilizando o *cut off* por TgRoc (absorbância 0,5), na diluição de 1:50.

Tabela 3 – Realividade (%) por ELISA do antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* frente às diferentes diluições de amostras de soros de diferentes patologias.

Grupo (nº de amostras)	Diluição Soros	<i>Cut off</i>		
		TgRoc	M+2DP	MxS
NC (13)	1:50	100	100	100
	1:250	93	100	100
	1:500	87	93	100
CN (100)	1:50	2	5	2
	1:250	5	7	9
	1:500	6	11	29
Hi (49)	1:50	73,5	80	78
	1:250	63,5	67	72
	1:500	96	98	100
T (13)	1:50	61,5	62	62
	1:250	46	54	54
	1:500	46	54	69
OP (13)	1:50	69	69	69
	1:250	30	30	46
	1:500	77	77	85

Amostras NC = neurocisticercose

Amostras Hi = hidatidose

Amostras CN = controle negativo

Amostras T = teníase

Amostras OP = outras parasitoses

TgRoc = Curva Receiver Operating Characteristic

M+2DP = Média das absorbâncias das amostras CN mais dois desvios-padrão

MxS = Máxima sensibilidade

4.4 REATIVIDADE DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS ESPECÍFICAS DOS ANTÍGENOS LH-Eg E LV-Tcra E DE REATIVIDADE CRUZADA ENTRE AS DIFERENTES AMOSTRAS DOS DIFERENTES GRUPOS

Na Tabela 4 estão apresentados os AcMos anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* produzidos e suas reatividades por immunoblot utilizando os antígenos LH-Eg e LV-Tcra.

Tabela 4 – Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* para os antígenos de líquido hidático de *E. granulosus* (LH-Eg) e de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) pelo teste immunoblot.

AcMos	Clone	Immunoblot	
		LH-Eg*	LV-Tcra
Anti-LH-Eg	K ₂ 12	A	(-)
	K ₂ 20	A	(-)
	K ₂ 24	A	(-)
	K ₂ H	B	(-)
	K ₂ J	B	(-)
Anti-rAgB	K ₂ 3	C	(-)
	K ₂ 7	C	(-)
Anti-LV-Tcra	LV	8-kDa	18- e 14-kDa
Anti-ES	ES	8-kDa	18- e 14-kDa

Padrão de reconhecimento das bandas protéicas

*A = 79-, 67-, 24-, 16- e 8-kDa

*B = 79-, 67- e 8-kDa

*C = 24-, 16- e 8-kDa

(-) = ausência de reatividade

Na Figura 5 são ilustrados os resultados de immunoblot com os antígenos LH-Eg e LV-Tcra utilizando 5 AcMos anti-LH-Eg, 2 anti-antígeno rAgB, um anti-LV-Tcra e um anti-ES-Tcra.

Figura 5 - Immunoblot (SDS-PAGE: 5-20%) dos antígenos de líquido hidático de *E. granulosus* (Ag LH-Eg) (10,0 µg/mm) e de líquido vesicular de *T. crassiceps* (Ag LV-Tcra) (7,0 µg/mm) utilizando diferentes AcMos. B = controle do conjugado.

Os resultados do immunoblot com o antígeno LH-Eg mostraram que todos os AcMos anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* identificaram a fração 8-kDa. Todos os AcMos anti-LH-Eg reconheceram as frações 79- e 67-kDa. As frações 24- e 16kDa foram reconhecidas pelos AcMos anti-LH-Eg (K₂12, K₂20 e K₂24) e anti-antígeno rAgB (K₂3 e K₂7).

Os resultados do immunoblot com antígeno LV-Tcra mostraram que os AcMos anti-*E. granulosus* reconheceram as frações 94-; 67-; 43- e 35-kDa. Essas frações também foram identificadas pelo controle do conjugado. Os AcMos anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra reconheceram as frações 18- e 14-kDa do antígeno LV-Tcra.

A Figura 6 apresenta os resultados da identificação de frações do antígeno LH-Eg com amostras de pacientes com hidatidose, neurocisticercose, teníase, outras parasitoses e controle negativo.

Figura 6 - Immunoblot (SDS-PAGE 5-20%) utilizando antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* (Ag LH-Eg) (10,0 µg/mm) com algumas amostras de pacientes com hidatidose (Hi), neurocisticercose (NC), teníase (T), outras parasitoses (OP) e controle negativo (CN). Padrão de massa molecular (P).

Anticorpos presentes nas 49 amostras Hi identificaram as frações de 79-; 67-; 57-; 43-; 38-; 24-; 16- e 8-kDa do antígeno LH-Eg.

Os anticorpos presentes em amostras de NC reconheceram as frações de 79- e 67-kDa do antígeno LH-Eg. A reatividade das amostras de teníase foi para as frações 79-, 67- e 57-kDa; a de outras parasitoses para as frações 67- e 57-kDa e controle negativo para a fração 67-kDa do antígeno LH-Eg.

A Figura 7 mostra a frequência de reatividade dos diferentes peptídeos do antígeno LH-Eg no imunoblot com amostras de pacientes com hidatidose, neurocisticercose, teníase, outras parasitoses e controle negativo.

A análise global dos resultados indica que os peptídeos 43-, 38-, 24-, 16- e 8-kDa foram específicos para identificar anticorpos na hidatidose no presente estudo.

Figura 7 – Frequência de reatividade das frações do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* no imunoblot em diferentes amostras de soros. Hidatidose (Hi) (n=49), neurocisticercose (NC) (n=15), teníase (T) (n=13), outras parasitoses (OP) (n=13) e controle negativo (CN) (n=100).

A Figura 8 apresenta a frequência de reatividade das frações do antígeno LV-Tcra com amostras de pacientes com neurocisticercose, hidatidose, teníase, outras parasitoses e controle negativo.

Figura 8 - Immunoblot (SDS-PAGE: 5-20%) utilizando antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* (Ag LV-Tcra) (7,0 µg/mm) com algumas amostras de pacientes com neurocisticercose (NC), hidatidose (Hi), teníase (T), outras parasitoses (OP) e controle negativo (CN). Padrão de massa molecular (P).

As amostras NC foram reativas no imunoblot utilizando antígeno LV-Tcra, as quais reconheceram diferentes frações entre 97- a 8-kDa, predominando os peptídeos 18- e 14-kDa.

Os resultados mostraram que as amostras de Hi reativas no ELISA-LV-Tcra apresentaram reatividade para diferentes frações entre 97- a 8-kDa e também a fração 14-kDa do antígeno LV-Tcra.

Das 13 amostras de teníase positivas no ELISA-LV-Tcra foram reativas com as frações 94-; 70-; 67-, 57-, 28-, 14- e 8-kDa do antígeno LV-Tcra e a

reatividade das amostras OP foi para as frações 82-, 67- e 38-kDa.

As amostras CN que foram positivas no ELISA quando ensaiadas por imunoblot apresentaram reatividade com proteínas acima de 40-kDa do antígeno LV-Tcra.

A Figura 9 mostra a freqüência de reatividade dos diferentes peptídeos do antígeno LV-Tcra no imunoblot com amostras de pacientes com neurocisticercose, hidatidose, teníase, outras parasitoses e controle negativo.

A análise global dos resultados indica que o peptídeo 18-kDa foi específico para o diagnóstico da NC no presente estudo.

Figura 9 – Freqüência de reatividade das frações do antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* no imunoblot em diferentes amostras de soros. Neurocisticercose (NC) (n=15), hidatidose (Hi) (n=49), teníase (T) (n=13), outras parasitoses (OP) (n=13) e controle negativo (CN) (n=100).

5 DISCUSSÃO

Os estudos de reatividade dos antígenos LH-Eg e LV-Tcra com AcMos anti-*E. granulosus* e anti-*T. crassiceps* e amostras humanas foram realizados para melhor elucidar as reações cruzadas entre as duas espécies já observadas em outros estudos (BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005), direcionando o presente trabalho para identificar as proteínas antigênicas responsáveis pelas reatividades específicas e cruzadas entre as duas espécies.

Os ensaios de caracterização dos antígenos LH-Eg e LV-Tcra incluíram SDS-PAGE, Immunoblot e ELISA.

O SDS-PAGE mostrou um padrão complexo de proteínas entre 97- a 8-kDa do antígeno LH-Eg e entre 97- a 14-kDa do antígeno LV-Tcra (Figura 2).

As proteínas do LH-Eg identificadas com maior intensidade no SDS-PAGE foram 79-; 67-; 57-; 30-; 28-; 24-; 20-; 16- e 8-kDa (Figura 2), frações essas que havia sido identificadas anteriormente por outros autores (LIGHTOWLERS et al., 1989; AL-YAMAN; KNOBLOCH, 1989; ISHIDA et al., 2003).

As frações 67- e 57-kDa identificadas por SDS-PAGE em nossos estudos, aparentemente fazem parte do antígeno 5 do líquido hidático de *E. granulosus* como relatado em estudo de Lightowlers et al. (1989). O Ag5 vem sendo utilizado em ensaio de imunodifusão para o diagnóstico da hidatidose e não é considerado específico para essa patologia, apresentando reatividade inclusive com amostras de soro de pacientes com cisticercose e outras doenças parasitárias (MADDISON et al., 1989). O SDS-PAGE também identificou as frações 24-; 20-; 16- e 8-kDa, que aparentemente fazem parte do AgB obtido de líquido hidático de *E. granulosus*, as quais estão incluídas entre as específicas para o diagnóstico da hidatidose, que são as 32-; 24-; 20-; 17-; 16- , 12- e 8-kDa (XUE et al., 1987; SHEPHERD et al., 1987;

MADDISON et al., 1989). Rigano et al. (2001) também relataram ser o AgB específico no diagnóstico da hidatidose. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) identificaram por SDS-PAGE as bandas 110-; 42-; 37-; 34- e 12-14-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*. Não há estudos indicando a possível similaridade antigênica entre os antígenos 5 e B.

Em relação ao antígeno LV-Tcra analisado no SDS-PAGE, um alta intensidade de reatividade foi observada na região abaixo de 30-kDa (Figura 2), que corresponde aproximadamente a 50% do antígeno (BUENO, 1999), que são imunodominantes no diagnóstico da cisticercose (BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2001; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Uma abordagem na avaliação da eficiência de frações antigênicas para um ensaio é a caracterização das frações reativas para anticorpos específicos. É importante determinar a composição de preparações antigênicas específicas ao diagnóstico, para saber o que faz delas mais eficientes que outras, principalmente, qual a diferença dessas com as responsáveis pela reação cruzada. Os AcMos representam excelentes ferramentas para esta abordagem (ESPÍNDOLA, 2004).

Os ensaios de caracterização do antígeno LH-Eg utilizando AcMos anti-*E. granulosus* por teste ELISA, mostraram reatividade de todos os AcMos anti-*E. granulosus* frente ao antígeno estudado (Tabela 1). Os AcMos anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra quando ensaiados com antígeno LV-Tcra apresentaram intensa reatividade por teste ELISA (Tabela 1), concordando com dados já relatados na literatura (ESPÍNDOLA, 2004). Outros autores produziram cinco AcMos anti-*E. granulosus*, três reagiram apenas com o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* (YANG et al., 1989). Estudos anteriores com os AcMos anti-*T. crassiceps* mostraram reação cruzada com antígenos de *Taenia solium* e *Taenia saginata*, no entanto, não foi

analisada a reatividade dos AcMos com antígeno de *E. granulosus* (ESPÍNDOLA, 2004).

Na análise do ELISA com antígeno LV-Tcra, apenas um AcMo anti-antígeno recombinante de *E. granulosus* (K₂7) foi reativo nesse teste (Tabela 1) .

Analizando a reatividade do antígeno LH-Eg com diferentes diluições das amostras humanas na opção de se obter mais sensibilidade, pode-se observar que os melhores resultados obtidos no ELISA-LH-Eg foram com a diluição a 1:250 no *cut off* M+2DP (Figura 3; Tabela 2).

Nossos resultados corroboraram com os de Kong et al. (1989) e Ishida et al. (2003), onde todas as amostras de hidatidose na diluição 1:100 foram reativas por ELISA utilizando o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) estudaram 20 amostras de hidatidose e todas foram reativas com o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*.

Quando a análise do antígeno LH-Eg foi feita com amostras de NC por ELISA, foi observada presença de reatividade cruzada em 66,5% das amostras (Figura 3). Um alto índice de reatividade cruzada (44%) entre soros de NC e antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* também foi observado em estudos de Ishida et al. (2003). Poretti et al. (1999) e Kong et al. (1989) utilizaram antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* e encontraram 58 e 49,3%, respectivamente, de reatividade com amostras de neurocisticercose. Isso é justificado porque *Taenia* e *Echinococcus* pertencem à mesma família, compartilhando componentes antigênicos comuns. Pacientes com essas infecções em áreas onde elas se superpõem não podem ser discriminados por ELISA, devido aos resultados falso-positivos, devendo ser confirmados por técnicas mais específicas como o immunoblot (GOTTSTEIN et al., 1986; ISHIDA et al., 2003). Proteínas

recombinantes de *E. granulosus* (AgB8/2; EG95 e EpC1) estão sendo estudadas como antígenos candidatos no imunodiagnóstico da hidatidose, pois podem melhorar a especificidade do imunoensaio e reduzir o número de reações cruzadas (LI et al., 2003; VIRGINIO et al., 2003; CARMENA; BENITO; ERASO, 2007) pelo direcionamento da produção de antígenos específicos para anticorpos presentes em amostras de pacientes com hidatidose. McVie et al. (1997) encontraram 65% de sensibilidade com o antígeno recombinante AgB de *E. granulosus* e amostras de soro humano. Por outro lado, Li et al. (2003) encontraram 92,2% de sensibilidade e especificidade acima de 95,6% utilizando antígeno recombinante de *E. granulosus* (rEpC1 - 41-kDa) e amostras de hidatidose.

Em relação às amostras de teníase (*Taenia saginata*), a reatividade foi de 46% (Figura 3; Tabela 2). Kong et al. (1989) estudaram 10 amostras de pacientes infectados e obtiveram 30% de reatividade com o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*.

A reatividade do antígeno de LH-Eg com amostras CN foi de 4% (Figura 3; Tabela 2), sendo superior aos resultados de Poretti et al. (1999) que encontraram 0,5% em 200 soros de indivíduos saudáveis utilizando o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) não encontraram reatividade entre amostras de indivíduos saudáveis e antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*.

Uma alta reatividade foi observada entre amostras de outras parasitoses e antígeno de LH-Eg, correspondendo a 84,5% (Figura 3; Tabela 2). Essa alta reatividade foi superior a encontrada por Ishida et al. (2003), que mostraram 22,5% e 20% de reatividade entre o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* e amostras de toxocaríase e esquistossomose, respectivamente. Al-Yaman e Knobloch (1989) mostraram 74% de reatividade com amostras de outras parasitoses (5-toxocaríase;

4-fascioloses; 5-filarioses; 2-paragonimias; 3-esquistossomose e 15-cisticercose) e o antígeno de *E. granulosus*. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) estudaram 6 amostras de toxoplasmose e uma apresentou reatividade com o antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*.

Apenas uma amostra para cada patologia, ascaridíase, esquistossomose e estrongiloidíase, foram ensaiadas e apresentaram reatividade com o antígeno LH-Eg (Figura 3). Estudos de Koosha, Fesharaki e Rokni (2004) mostraram reatividade entre amostras de estrongiloidíase com antígeno de *E. granulosus*. Poretti et al. (1999) no ELISA utilizando antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* encontraram positividade em duas de seis amostras de ascaridíase. Ahmad et al. (2002) encontraram 82,6% de reatividade entre amostras de soros pacientes infectados por *Ascaris lumbricoides* e o antígeno de excreção-secreção de *Toxocara canis* em área altamente endêmica para o *Ascaris lumbricoides*, no entanto nenhum dos indivíduos supostamente saudáveis advindos de áreas de alta e baixa endemicidade de ascaridíase e pacientes com outras parasitoses (hidatidose e cisticercose) apresentaram reatividade frente a esse antígeno. Em estudos feitos por Lynch et al. (1988) foi confirmada a reação cruzada entre o antígeno de excreção e secreção de *Toxocara canis* e amostras de pacientes com ascaridíase, sendo que esses soros pré-absorvidos com antígeno de *Ascaris lumbricoides* apresentaram uma redução de 42,3% para 32,2% de reatividade por ELISA.

Apesar do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* mostre alto índice de reatividade com amostras de NC, teníase e outras parasitoses, ele vem sendo utilizado na triagem diagnóstica da hidatidose por ELISA (KONG et al., 1989; PORETTI et al., 1999; WHO/OIE, 2001).

Considerando os ensaios realizados com diferentes diluições do soro e *cut off*, a diluição 1:50 e *cut off* obtido por TgRoc permitiram a obtenção de resultados significativamente mais específicos sem alterar a sensibilidade do teste ELISA para o antígeno LV-Tcra (Figura 4; Tabela 3).

No estudo de reatividade do antígeno LV-Tcra por ELISA com amostras humanas, foi observado que 100% das amostras NC foram reativas na diluição 1:50, independente do *cut off* (Figura 4), sendo eleito o *cut off* TgRoc por apresentar uma melhor especificidade. Nossos resultados corroboram mais uma vez com os já relatados na literatura, onde estudos de Ishida et al. (2003) e Bueno et al. (2000) mostraram que o antígeno LV-Tcra vem sendo eficiente no diagnóstico da NC, com 100% de reatividade.

Quando ensaiadas as amostras de hidatidose por ELISA-LV-Tcra foi observada intensa reatividade (Figura 4; Tabela 3). Ensaios semelhantes feitos por nossa equipe foi observado reatividade de 77,2% entre amostras de hidatidose e antígeno LV-Tcra (ISHIDA et al., 2003). Kong et al. (1989) também mostraram reatividade entre amostras de hidatidose e o antígeno de líquido vesicular *T. crassiceps*. Como a clínica e a epidemiologia da hidatidose e da neurocisticercose são distintas, o antígeno LV-Tcra poderia ser utilizado também no diagnóstico da hidatidose, uma vez que esse antígeno é de fácil obtenção e manutenção em laboratório.

A máxima reatividade no ELISA utilizando antígeno LV-Tcra e amostras de OP, foi observada com amostras de toxocaríase (7-54%) na diluição 1:50 (Figura 4). Ishida et al. (2003) mostraram que 15% de amostras de toxocaríase foram reativas com antígeno LV-Tcra. As amostras de ascaridíase e estrongiloidíase também foram reativas nesse teste (Figura 4). Em estudos anteriores, Bragazza et al. (2002)

mostraram que 9 (39,1%) amostras de outras parasitoses (2-toxocariase; 5-toxoplasmose; 1-doença de Chagas e 1-esquistossomose) foram reativas com o mesmo antígeno e Bueno et al. (2000) estudando 23 amostras de outras parasitoses, obtiveram 9 (39%) amostras reativas com o antígeno LV-Tcra. Rossi et al. (2000) estudando três extratos antigênicos de *T. crassiceps* e amostras com outras enfermidades (parasitárias e bacterianas), o líquido vesicular de *T. crassiceps* apresentou menor reatividade em comparação aos outros extratos. Seria necessário um estudo com um maior número de amostras de ascaridíase, esquistossomose e estrogiloidíase para obtenção de resultados mais precisos.

O teste ELISA-LV-Tcra apresentou reatividade de 2% na diluição 1:50 com amostras controle negativo. Bueno et al. (2000) estudaram 35 amostras controle negativo por ELISA com o antígeno LV-Tcra e obtiveram duas amostras reativas na diluição 1:100. Nos estudos de Bragazza et al. (2002) apenas uma amostra do grupo controle (3,6%) foi reativa com o antígeno LV-Tcra. Em estudos feitos por nossa equipe, Ishida et al. (2003) encontraram 46,7% de especificidade, um valor menor quando comparado aos trabalhos de Bragazza et al. (2002) e Bueno et al. (2000) que obtiveram 96,4 e 80% de especificidade com o antígeno LV-Tcra, respectivamente.

Alguns AcMos anti-*E. granulosus* reconheceram as frações 79-; 67-; 24-; 16- e 8-kDa (Tabela 4; Figura 5) no imunoblot do antígeno LH-Eg, frações essas já identificadas por outros autores. Segundo Xue et al. (1987); Shepherd et al. (1987) e Maddison et al. (1989), as proteínas de 32-; 24-; 20-; 17-; 16-; 12- e 8-kDa são consideradas específicas.

Os AcMos anti-*T. crassiceps* reconheceram a fração 8-kDa do antígeno LH-Eg. No ELISA LH-Eg o AcMo anti-ES-Tcra não apresentou reatividade mas foi

positivo no imunoblot com antígeno LH-Eg. Muito provavelmente devido à separação do antígeno pelo SDS-PAGE, favorecendo a reatividade com o AcMo.

Os AcMos anti-Tcra e anti-ES-Tcra reconheceram as proteínas 18- e 14-kDa do antígeno LV-Tcra. Em estudos anteriores, Espíndola et al. (2002) produziram AcMo anti-ES-Tcra que identificaram por imunoblot as proteínas 18- e 14-kDa em LCR de pacientes com NC. Em outros estudos, Espíndola et al. (2005) obtiveram dois AcMos anti-*T. crassiceps* (um anti-LV-Tcra e um anti-ES-Tcra). Esses dois AcMos reconheceram as proteínas 18- e 14-kDa do antígeno LV-Tcra. No atual trabalho foi observado que as frações 94-, 67-, 43- e 35-kDa do antígeno LV-Tcra foram reconhecidas pelos AcMos anti-*E. granulosus*, inclusive no controle do conjugado (Figura 5). Provavelmente, foram proteínas produzidas no camundongo, retiradas juntamente com os cisticercos para obter o antígeno LV-Tcra e foram reconhecidas pelo conjugado anti-camundongo.

No imunoblot, as amostras de hidatidose reconheceram as frações 79-, 67-, 57-, 43-, 38-, 24-, 16- e 8-kDa do antígeno LH-Eg (Figuras 6 e 7). Esses resultados são em parte semelhantes aos obtidos por Poretti et al. (1999) que identificaram por imunoblot as frações 34-, 29- e 8-kDa por anticorpos presentes em soros de pacientes com hidatidose, inclusive nossos AcMos anti-*E. granulosus* reconheceram a proteína de 8-kDa (Figura 5).

As frações 43-, 38-, 24-, 16- e 8-kDa do antígeno LH-Eg, no presente estudo, foram consideradas específicas por reagir com uma alta frequência apenas com as amostras de hidatidose (Figura 7). Aparentemente, as frações 16- e 8-kDa reconhecidas por essas amostras de soros (Figura 6) parecem fazer parte do AgB (20 a 8-kDa) (CARMENA; BENITO; ERASO, 2006) e também são específicas no diagnóstico da hidatidose, confirmando achados de outros autores (SHEPHERD;

McMANUS, 1987; XUE et al., 1987; MADDISON et al., 1989). Shepherd e McManus (1987) consideraram as frações 20; 16 e 12-kDa como específicas; Xue et al. (1987) observaram que as frações 32; 24; 17 e 12-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* e Maddison et al. (1989) a 8-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*, como específicas para o diagnóstico da hidatidose. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) identificaram as frações 110-, 42-, 37-, 34-, 20- e 12-14-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus* por anticorpos presentes nos soros de pacientes com hidatidose. Ayadi et al. (1995) ensaiaram 105 soros de pacientes com hidatidose por immunoblot e identificaram as proteínas 92-, 35-, 30-, 21- e 8-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*.

As elevadas antigenicidade e imunogenicidade das frações 24-; 16- e 8-kDa do antígeno LH-Eg foram evidenciadas pela reatividade dos anticorpos de soros de pacientes com hidatidose e pela facilidade de clonagem de linfócitos B secretores de anticorpos específicos.

Quando a especificidade do antígeno LH-Eg foi analisada por immunoblot com amostras NC, Teníase e OP, o teste mostrou que as frações responsáveis pela reatividade cruzada foram 79-, 67- e 57-kDa (Figura 6). Essa inespecificidade variou de cerca de 7% (79-kDa) a 38% (57-kDa). As proteínas 67- e 57-kDa parecem fazer parte do Ag5 (CARMENA; BENITO; ERASO, 2006) que tem mostrado intensa reatividade cruzada com amostras de NC e outras parasitoses. Outros autores confirmaram essa reatividade cruzada e observaram que de 26 amostras de NC, 23 foram reativas para o antígeno de *E. granulosus* (MADDISON et al., 1989). Kong et al. (1989) também observaram que proteínas do antígeno de *E. granulosus* localizadas entre 135- a 24-kDa foram reconhecidas por amostras de NC. Sbihi, Janssen e Osuna (1996) identificaram as frações 110-, 42- e 37-kDa do antígeno de

líquido hidático de *E. granulosus* utilizando amostras de soros de pacientes com cisticercose. Nesse mesmo estudo, amostras de indivíduos supostamente saudáveis reconheceram as frações 42-, 37- e 20-kDa do antígeno de líquido hidático de *E. granulosus*. As amostras negativas apresentaram melhores resultados, sendo que apenas 2% reconheceu a fração 67-kDa do antígeno LH-Eg.

Objetivando esclarecer as frações do antígeno LV-Tcra específicas para NC e com as demais amostras humanas, foi realizado imunoblot (Figuras 8 e 9). Os estudos mostraram que essas amostras reconheceram frações entre 97- e 8-kDa.

Maior frequência de reatividade com o grupo NC foi observado com as proteínas 18- e 14-kDa. Nossos resultados corroboram com os obtidos por outros autores (BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003). As amostras de hidatidose, teníase, OP e controle negativo apresentaram variada reatividade, sendo que pelo menos uma das frações antigênicas foi identificada por essas amostras. A única fração não reconhecida por esses grupos foi a de 18-kDa (Figuras 8;9).

De fato, em outros estudos, as amostras de hidatidose cruzaram com frações acima de 30-kDa (BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005). Embora a fração 14-kDa seja descrita como específica para o imunodiagnóstico da NC (BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2005), ela foi reconhecida por amostras de pacientes com hidatidose (n=6) e teníase (n=2). Pode ser que nessa mesma região estejam localizados epítomos diferentes que reagem distintamente com anticorpos presentes em amostras de teníase e hidatidose. Os anticorpos de amostras com NC reconheceram as frações de 18-kDa e 14-kDa numa área extensa indicando reconhecimento das porções glicoprotéicas.

As amostras OP reconheceram frações acima de 38-kDa do antígeno LV-Tcra (Figura 8). Nos soros controle negativo, houve reatividade menos freqüente com essas frações de alta massa molecular.

A reatividade das amostras Hi foi intensa com as frações 79-, 67- e 57-kDa, que podem ser comuns entre os parasitos, mas essas mesmas frações também foram reconhecidas, em menos freqüência por amostras de pacientes com NC. Nossa expectativa incluía a possibilidade de detectarmos frações no antígeno LV-Tcra que se mostrassem promissoras para futuros estudos do complexo Equinococose-Hidatidose. É fato que as duas, cisticercose e hidatidose, são doenças de aspectos clínicos distintos o que poderá permitir o uso de antígeno heterólogo de obtenção fácil para o diagnóstico da hidatidose.

O emprego do antígeno LV-Tcra para estudos epidemiológicos da cisticercose e hidatidose apenas poderá ter finalidade de triagem, necessitando posteriormente de testes confirmatórios.

Nesse sentido, nos parece que a melhor abordagem para continuidade desse trabalho inclui a obtenção de antígenos recombinantes, específicos de cada um dos parasitos.

6 CONCLUSÃO

- 1) Os antígenos LH-Eg e LV-Tcra mostraram reatividade cruzada variando entre 46 a 84,5% frente a anticorpos de amostras humanas e monoclonais;
- 2) As frações 24-, 16- e 8-kDa do LH-Eg foram consideradas específicas por serem reconhecidas apenas por anticorpos de amostras pacientes com hidatidose. As frações do antígeno LH-Eg responsáveis pela reatividade inespecífica/cruzada foram 79-, 67- e 57-kDa;
- 3) A fração do antígeno LV-Tcra específica para anticorpos de pacientes com NC foi 18-kDa, por ter sido reconhecida pelos AcMos anti-Tcra e amostras de NC;
- 4) As frações entre 94- e 21-kDa do antígeno LV-Tcra mostraram alguma reatividade cruzada com as amostras de hidatidose, teníase, outras parasitoses. As frações 14- e 8-kDa foram reconhecidas por amostras de hidatidose e teníase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, B.; BHATTI, G.; THOKAR, M.A.; MALLA, N. Human toxocariasis: concomitant parasitism in Srinagar, Kashmir, India. **Indian Journal of Phatology Microbiology**, v.45. n.3. p.315-318, 2002.

AL-YAMAN, F.M.; KNOBLOCH, J. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.37. p.101-108, 1989.

ARAMBULO III, P. Public health importance of cystic echinococcosis in Latin America. **Acta Tropica**, v.67. p.113-124, 1997.

AYADI, A.; DUTOIT, E.; SENDID, B.; CAMUS, D. Specific diagnostic antigens of *Echinococcus granulosus* detected by western blot. **Parasite**, v.2. n.2. p.119-223, 1995.

BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMURA, P.M.; ESPÍNDOLA, N.M. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of rural brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44. n.1. p.7-12, 2002.

BRASIL. Resolução n. 196 de 10 de out. 1996. O plenário do Conselho Nacional de Saúde aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 201, 16 out. 1996. Seção 1, p. 21082-21085.

BUENO, E.C. **Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *Taenia solium* e *Taenia crassiceps***. São Paulo, 1999. 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38. n.1 p.146-151, 2000.

1

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CAPRON, A.; VERNES, A.; BIGUET, J. (1967). Le diagnostic immunoélectrophorétique de l' hidatidose. Le Kyste Hydatique du Foie. p.27-40 *apud* CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v.98. p.74-86, 2006.

CARLOS, E.; BALOGH, K.; LUBROTH, J.; AMANFU, W.; SPEEDY, A.; BATTAGLIA, D.; DOMENECH, J. Veterinary public health activities at FAO: Cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v.55. p.305-306, 2006.

CARMENA, D.; MARTINEZ, J.; BENITO, A.; GUISANTES, J.A. Shared and non-shared antigens from three different extracts of the metacestode of *Echinococcus granulosus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100. n.8. p.861-867, 2005.

CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v.98. p.74-86, 2006.

CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Avances recientes en el inmunodiagnóstico de la hidatidosis human. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v.25. n.4. p.263-269, 2007.

CDC. Center for Disease Control. **Life Cycle of *Echinococcus***. Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em 10 junho 2007.

COLTORTI, E.; CAMMARIERI, G. Inmunodiagnóstico de hidatidosis: evaluación de antígenos de líquido hidatídico y de líquido vesicular de cisticerco de *Taenia crassiceps*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35. n.2. p.155-162, 1993.

CRAIG, P.S.; ROGAN, M.T.; CAMPOS-PONCE, M. Echinococcosis: disease, detection and transmission. **Parasitology**, v.127. p.5-20, 2003.

ECKERT, J.; DEPLAZES, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17. n.1. p.107-135, 2004.

ESPÍNDOLA, N.M. ***Taenia solium* e *Taenia crassiceps*: caracterização de antígenos e obtenção de anticorpos monoclonais**. São Paulo, 1999. 136p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ESPÍNDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.X.; FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from *in vitro* cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.96. n.4. p.361-368, 2002.

ESPINDOLA, N.M. **Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana**. São Paulo, 2004. 95p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

ESPINDOLA, N.M.; IHA, A.H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O.M.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MAIA, A.A. M.; PERALTA, J.M.; VAZ, A.J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18 and 14 kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal Clinical Microbiology**, v.43. n.7. p.3178-3184, 2005.

FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa. v.40. p.969-990, 1962.

GOTTSTEIN, B., TSANG, V.C.W., SCHANTZ, P.M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v.35, n.2, p.308-313, 1986.

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v.185, n.1. p.123-132, 1995.

HEATH, D.D.; JENSEN, O.; LIGHTOWLERS, M.W. Progress in control of hydatidosis using vaccination – a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. **Acta Tropica**, v.85. p.133-143, 2003.

ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G., FERREIRA, A.W., HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animal. **Acta Tropica**, v.89. n.73-84, 2003.

KAMENETZKY, Laura. Producción de recombinantes (mensagem eletrônica). Mensagem recebida por espindo@usp.br em 15 de março de 2007.

KHABIRI, A.R.; BAGHERI, F.; ASSMAR, M.; SIAVASHI, M.R. Analysis of specific IgE and IgG subclass antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. **Parasite Immunology**, v.28. p.357-362, 2006.

KLOETZEL, K.; PEREIRA, J.A.A. A hidatidose humana no Rio Grande do Sul (Brasil): Estimativa de sua importância para a saúde pública do país. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.36. n.6. p.549-55, 1992.

KONG, Y., KANG, S.; CHO, S.; MIN, D. Cross-reacting specific antigenic components in cystic fluid from metacestodes of *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*. **Korean Journal of Parasitology**, v.27. n.2. p.131-139, 1989.

KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M.B. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Indian Journal of Gastroenterology**, v.23. n.6. p.2146-216, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227. p.680-685, 1970.

LAMBIN, P.; ROCHU, D.; FINE, J.M. A new method for determination of molecular weights by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. **Annals Biochemical**, v.74. p.567-575, 1976.

LI, J.; ZHANG, W.; WILSON, M.; ITO, A.; McMANUS, D.P. A novel recombinant antigen for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188. p.1951-1960, 2003.

LIGHTOWLERS, M.W.; LIU, D.; HARALAMBOUS, A.; RICKARD, M.D. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.37. p.171-182, 1989.

LIGHTOWLERS, M.W. et al. (1996). Host-protective fragments and antibody binding epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen. *Parasite Immunol.* v.18. p.507-513 *apud* LIGHTOWLERS, M. W.; FLISSER, A.; GAUCI, C. G.; HEATH, D. D.; JENSEN, O.; ROLFE, R. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. **Parasitology Today**, v.16. n. 5. p.191-196, 2000.

LIU, D.; RICKARD, M. D.; LIGHTOWLERS, M. W. A strategy for production of monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B. **International Journal for Parasitology**, v.22. p.1013-1016, 1992.

LYNCH, N.R.; WILKES, L.K.; HODGEN, A.N.; TURNER, K.J. Specificity of Toxocara ELISA in tropical populations. **Clinical Immunology Research Unit**, v.10. n.3. p.323-327, 1988.

LORENZO, C.; SALINAS, G.; BRUGNINI, A.; WERNTEDT, C.; HELLMAN, U.; GONZÁLEZ-SAPIENZA, G. *Echinococcus granulosus* antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. **Biochemical Journal**, v.369. p.191-198, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemical**, v.193. p.265-275, 1951.

MADDISON, S.E.; SLEMENDA, S.B.; SCHANTZ, P.M.; FRIED, J.A.; WILSON, M.; TSANG, V.C.W. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40. n.4. p.377-383, 1989.

MAMUTI, W.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; XIAO, N.; NAKAYA, K.; ISHIKAWA, Y.; YAMASAKI, H.; LIGHTOWLERS, M. W.; ITO, A. Recent advances in characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. **Parasitology International**, v.55. p.57-62, 2006.

McVIE, A.; ERSFELD, K.; ROGAN, M.T.; CRAIG, P.S. Expression and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. **Acta Tropica**, v.67. p.19-35, 1997.

ORIO, R.; WILLIAMS, J.F.; PÉREZ ESANDI, M.V.; ORIO, C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.20. p.569-574 *apud* CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v.98. p.74-86, 2006.

ORTONA, E.; RIGANO, R.; BUTTARI, B.; DELUNARDO, F.; IOPPOLO, S.; MARGUTTI, P.; PROFUMO, P.; PROFUMO, E.; TEGGI, A.; VACCARI, S.; SIRACUSANO, A. An update on immunodiagnosis of cystic echinococcosis. **Acta Tropica**, v.85. p.165-171, 2003.

PARDINI, A.X.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39. n.9. p.3368-3372, 2001.

PARIJA, S.C. A review of some simple immunoassays in the serodiagnosis of cystic hydatid disease. **Acta Tropica**, v.70. p.17-24, 1998.

PORETTI, D.; FELLEISEN, E.; GRIMM, F.; PFISTER, M.; TEUSCHER, F.; ZUERCHER, C.; REICHEN, J.; GOTTSTEIN, B. Differential immunodiagnosis between cystic hydatid disease and other cross-reactive pathologies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.2, p.193-198, 1999.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. **Parasitology Research**, v.91. p.412-438, 2003.

RIGANO, R.; PROFUMO, E.; BRUSCHI, F.; CARULLI, G.; AZZARA, A.; IOPPOLO, S.; BUTTARI, B.; ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; TEGGI, A.; SIRACUSANO, A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. **Infection and Immunity**, v.69. n.1. p.288-296, 2001.

RIGANO, R.; IOPPOLO, S.; ORTONA, E.; MARGUTTI, P.; PROFUMO, E.; ALI, M. D.; DI VICO, B.; TEGGI, A.; SIRACUSANO, A. (2002). Long-term serological evaluation of patients with cystic echinococcosis treated with benzimidazole carbamates. *Clin. Exp. Immunol.* v.129. p.485-492 *apud* CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v.98. p.74-86, 2006.

ROSSI, N.; RIVAS, I.; HERNANDEZ, M.; URDANETA, H. Inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis: estudio comparativo de extratos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* y *Taenia crassiceps*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.53. n.33. p.157-164, 2000.

SARAIVA, P.J. Hidatidose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap.30. p.307-315.

SBIHI, Y.; RMIQUI, A.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.N.; ORDUÑA, A. RODRIGUEZ-TORRES, A.; OSUNA, A. Comparative sensitivity of six serological tests and diagnostic value of ELISA using purified antigen in hydatidosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.15. p.14-18, 2001.

SBIHI, Y.; JANSSEN, D.; OSUNA, A. Serologic recognition of hydatid cyst antigens using different purification methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 24. p. 205-211, 1996.

SCHANTZ, P.M.; SHANKS, D.; WILSON, M. Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.29. n.4. p. 609-612, 1980.

SHEPHERD, J.; McMANUS, D.P. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.25. p.143-154, 1987.

SHEPHERD, J.C.; AITKEN, A.; McMANUS, D.P. (1991). A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.44. p.81-90 *apud* CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v.98. p.74-86, 2006.

TIECHER, Fátima. Obtenção do líquido hidático de *Echinococcus granulosus* (mensagem eletrônica). Mensagem recebida por esvindola@usp.br em 09 de agosto de 2007.

TIECHER, Fátima. Diagnóstico das amostras de pacientes com hidatidose (mensagem eletrônica). Mensagem recebida por fabianasilva@usp.br em 25 de setembro de 2007.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76. p.4350-4352, 1979.

VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; BARRETO, C.C.; FERREIRA, A.W.; LIVRAMENTO, A.B.B. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. **Serodiagnosis Immunotherapy in Infectious Diseases**, v.8. p.157-161, 1997 (a).

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57. p.354-357, 1997 (b).

VIRGÍNIO, V.G.; HERNANDEZ, A.; ROTT, M.B.; MONTEIRO, K.M.; ZANDONAI, A. F.; NIETO, A.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B. A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. **Clinical Experimental Immunology**, v.132. p.209-315, 2003.

WHO. ECKERT, J.; GEMMELL, M.A.; MESLIN, F.X.; PAWLOWSKI, Z. S. **WHO/OIE Manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern**. Paris: WHO/OIE, 2001.

XUE, H.C.; QIU, L.S.; ZHANG, Y.H.; ZHU, Z.X. Preliminary report on antibody detection in hydatid disease using the enzyme-linked immuno-transfer blot technique (Western blot). 1987. In: MADDISON, S.E.; SLEMENDA, S.B.; SCHANTZ, P.M.; FRIED, J.A.; WILSON, M.; TSANG, V.C.W. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40. n.4. p.377-383, 1989.

YANG, Q.L.; LIU, B.W.; MIAO, D.Q.; WANG, F.L. Preparation and identification of monoclonal antibodies against *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid antigen. **Hua Xi yi ke Da Xue Xue Bao**, v.20. n.4. p.373-376, 1989.

YILDIRIM, M.; ERKAN, N.; VARDAR, E. Hydatid cysts with unusual localizations: diagnostic and treatment dilemmas for surgeons. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.100. n.2. p.137-142, 2006.

ZHANG, W.; LI, J.; McMANUS, D.P. Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6. n.1. p.18-36, 2003.

ZHANG, W.; McMANUS, D.P. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. **Immunology and Medical Microbiology**, v.47. p.24-41, 2006.

ANEXOS

ANEXO 1 – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP nº 52

São Paulo, 27 de maio de 2003.

Ilmo(a). Sr(a)
Adelaide José Vaz

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 26 de maio passado, **APROVOU** o projeto intitulado "Cisticercose: Imunodiagnóstico, Antígenos, Resposta Imunológica e Aspectos Clínico-Epidemiológicos", apresentado por V.Sa.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

ANEXO 3 – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 51/2005

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Caracterização da antigenicidade de proteínas de Taenia crassiceps e Echinococcus granulosus utilizando anticorpos monoclonais anti-T. crassiceps e anti-E. granulosus e amostras de pacientes com neurocisticercose e hidatidose.” (Protocolo CEEA nº80), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Fabiana Érica Vilanova da Silva e do orientador(a) Adelaide José Vaz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 10/10/2005.

São Paulo, 10 de outubro de 2005.

Prof.ª Dr.ª Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA