UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

***T. solium* E *T. crassiceps*: CARACTERIZAÇÃO DOS
ANTÍGENOS E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS**

NOELI MARIA ESPÍNDOLA

**Dissertação para Obtenção do Grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Adelaide José Vaz

SÃO PAULO

1999

16080

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002466

Ficha Catalográfica

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

E771 Espindola, Noeli Maria
T. solium e T. crassiceps : caracterização de antígenos e obtenção
de anticorpos monoclonais / Noeli Maria Espindola. -- São
Paulo, 1999.
132p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Vaz, Adelaide José

1. Imunologia 2. Neurologia 3. Parasitologia I. T.
II. Vaz, Adelaide José, orientador.

615.37 CDD

NOELI MARIA ESPÍNDOLA

***T. solium* e *T. crassiceps*: CARACTERIZAÇÃO DE
ANTÍGENOS E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS**

Dissertação para Obtenção do Grau de MESTRE

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Adelaide José Vaz
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha
Primeiro Examinador

Dra. Mirthes Ueda
Segundo Examinador

São Paulo, 9 de dezembro de 1999.

T. solium AND *T. crassiceps*: CHARACTERIZATION OF THE
ANTIGENS AND PRODUCTION OF MONOCLONAL
ANTIBODIES

Este trabalho foi realizado na Seção de Sorologia e Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo o projeto aprovado pelo Comitê Técnico e Científico desta instituição.

Partes do projeto também foram desenvolvidos no laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Apoio Financeiro: FAPESP, processos 97/02682-7 e 97/2681-0

Dedico este trabalho

A Deus

A Deus tenho que agradecer a oportunidade de me fazer homem com inteligência, de ter me dado VIDA para conhecer muitas VIDAS, de me fazer forte o suficiente para não desistir, e sim, a cada dia, continuar a lutar por um ideal de VIDA. Obrigado meu Deus por eu ter VIDA.

Aos meus queridos pais José J. Espíndola e Maria A. Espíndola por
serem exemplos de vida e pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos meus irmãos, Atemi, Noeci, Noezi e Renata e cunhados Pedro Paulo, Paulo Henrique, Paulo Roberto e Cristiane, pelo incentivo e apoio.

Aos meus sobrinhos Henrique, Lucas, Gustavo, José Vitor, Leonardo, Tiago e Kamila, ao meu afilhado Ricardo e amigo Thiago pela alegria compartilhada durante este período.

A Nilmar Jonck, Enilza Jonck e Nelson Jonck pelo apoio e carinho recebido, mesmo distante.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ter dado suporte financeiro para execução do projeto e bolsa de estudos, sem o qual não seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Adelaide José Vaz, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por ter me dado a oportunidade de iniciar o curso de pós-graduação, pela orientação, dedicação, e exemplo de caráter de ética profissional.

Especialmente a Dra. Elizabeth Natal De Gaspari, da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pelos ensinamentos, paciência e dedicação em todas as etapas e sobretudo pela inestimável colaboração, sem as quais não teria sido possível realizar este trabalho.

A Profa. Dra. Kioko Takei, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e a Dra. Mirthes Ueda, da Divisão de Biologia Médica do Instituto Adolfo Lutz, pela detalhada revisão e sugestões no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira, do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas críticas e sugestões no Exame de Qualificação.

A Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e a Dra. Adriana Pardini Vicentini, da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio, colaboração e sugestões no Exame de Qualificação.

Ao pesquisador Paulo Mutuko Nakamura, da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz pela paciência em passar seus conhecimentos durante todo desenvolvimento experimental do projeto.

A Dra. Carmem Silva de Melo, chefe da Seção de Sorologia e Dra. Maria das Graça A. Alkmin, chefe da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, por ter permitido realizar parte do desenvolvimento experimental na Instituição.

A Dra. Vilma S. Trindade de Viana, pesquisadora da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo da Disciplina de Reumatologia, pela colaboração na parte experimental.

A Jaime Salvatierra Oporto e Orestes Martim Corrêa Rosado, médicos veterinário do Ministério de Agricultura de Santa Catarina, pelo incentivo e apoio.

Ao Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais e a Dra. Eide Dias Camargo, pesquisadora da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões no início do trabalho.

A Lia T. Bastos e Mônica C. Creergete da Seção de Coleção de Cultura, a Maria Salete Rosa da Seção de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz e a Rute K. C. Chang que contribuíram no desenvolvimento dos experimentos laboratoriais.

A todos os AMIGOS que compartilharam os bons momentos, e juntos contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
1 - Obtenção de Parasitas	23
1.1 - Forma Larvária de <i>T. crassiceps</i>	23
1.2 - Forma Larvária de <i>T. solium</i>	24
2 - Preparo dos Extratos Antigênicos	24
2.1 - Antígenos da Forma Larvária de <i>T. crassiceps</i>	24
2.2 - Antígenos da Forma Larvária de <i>T. solium</i>	25
3 - Amostras de Soros e LCR para Caracterização dos Antígenos	26
4 - Caracterização dos Antígenos	28
5 - Esquema de Imunização de Camundongos	34
6 - Cinética do Aparecimento de Anticorpos anti-LV-Tcra e anti-T-Tso no Soro de Camundongos BALB/c	36
7 - ELISA para Verificar a Cinética de Produção dos Anticorpos anti-LV-Tcra e anti-T-Tso	37
8 - Cromatografia de Afinidade com Sepharose 4B-Proteína A	38
9 - Obtenção de Anticorpos Monoclonais pela Tecnologia de Hibridomas	39

RESULTADOS	44
1 - Rendimento dos Antígenos Obtidos	44
2 - Caracterização dos Extratos Antigênicos por SDS-PAGE	46
3 - Análise dos Antígenos LV-Tcra e T-Tso por Blot	48
4 - Padronização do ELISA para Detecção de Anticorpos Ig-total, IgM, IgG e IgA em Amostras de Camundongos	54
5 - Cinética de Produção de Anticorpos em Camundongos BALB/c Imunizados com Antígenos de Cisticercos (LV-Tcra e T-Tso)	54
6 - Cromatografia de Afinidade com Sepharose 4B-Proteína A	62
7 - Peptídeos dos Antígenos LV-Tcra e T-Tso Reconhecidos pelos Anticorpos anti-LV-Tcra e anti-T-Tso	64
8 - Obtenção de Anticorpos Monoclonais pela Tecnologia de Híbridomas	79
 DISCUSSÃO	 93
 CONCLUSÕES	 110
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 111
 ANEXOS	 134

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de anticorpos monoclonais a partir da imunização de camundongos com antígenos de *Taenia crassiceps* (Tcra), que possibilitassem identificar antígenos referentes à *Taenia solium* (Tso) responsável pela infecção humana.

Na caracterização por SDS-PAGE, o antígeno de Tso mostrou um padrão heterogêneo de composição de peptídeos, enquanto o de líquido vesicular de Tcra (LV-Tcra) se apresentou mais homogêneo com elevada concentração de peptídeos de peso molecular inferior a 20kD.

Para o estudo da cinética de produção de anticorpos, foram utilizados camundongos BALB/c inoculados com antígeno LV-Tcra e total de *Taenia solium* (T-Tso), agrupados em 6 grupos de camundongos e 1 grupo controle, a saber: GI: salina; GII: 20µg de LV-Tcra; GIII e GV: 50µg de LV-Tcra; GIV: ~50µg de gel<30kD-Tcra; GVI: 50µg de eluato <30kD-Tcra e GVII: 50µg de T-Tso.

Nos grupos de camundongos imunizados com Tcra foram detectados bons níveis de anticorpos IgM, IgG e IgA pelo ELISA-Tcra a partir do 15^o dia após imunização, exceto o GIV que não apresentou anticorpos IgM. No blot-Tcra os anticorpos anti-Tcra mostraram reatividade para os peptídeos <20kD.

As três classes de imunoglobulinas anti-Tcra dos GII e GIII apresentaram reatividade anti-Tso no teste de ELISA. As amostras do GIV não demonstraram anticorpos IgM e IgG e o GVI não apresentou IgG com reatividade anti-Tso. No blot-Tso, GII, GIII e GVI apresentaram anticorpos IgM que identificaram o peptídeo 30kD e o GIV apresentou anticorpos IgM que identificaram os peptídeos 60, 43, 30 e 12kD. Os anticorpos IgG identificaram o 12kD de Tso em todos os grupos inclusive nos GIV e GVI, cujas amostras haviam apresentado ELISA-Tso negativo. Os anticorpos IgA presentes nos animais dos GIII, GIV e GVI identificaram os peptídeos 65, 50, 30 e 12kD de Tso.

Os animais do GVII imunizados com Tso apresentaram anticorpos IgM por ELISA-Tso a partir do 5^o dia, IgG a partir do 15^o dia e anticorpos IgA a partir do 39^o dia após imunização. Os anticorpos IgM identificaram especificamente os peptídeos 60, 43, 30 e 12kD; IgG os peptídeos 95, 75, 67, 60, 45, 40-35, 25, 18 e 12kD e IgA os peptídeos 45, 40-35, 28-25 e 18kD de Tso. Esses anticorpos reagiram cruzadamente com antígeno Tcra em menor intensidade quando comparado com a reatividade específica. Os peptídeos 72, 35, 30, 24 e 14kD de Tcra foram identificados por anticorpos IgM, 95, 70, 50, 30, 18 e 14kD por IgG e 70, 37, 35, 30, 18 e 14kD de Tcra por IgA.

A fusão com células esplênicas de camundongos imunizados com 50µg de LV-Tcra e células de mieloma P₃X₆₃-Ag8.653 foi realizada no 40^o dia após a imunização. A triagem dos clones híbridos por ELISA detectou 36 clones secretores de IgM e 117 clones secretores de IgG, que identificaram o antígeno de Tcra e 40 clones secretores de IgM e 10 clones secretores de IgG que identificaram Tso.

Após o teste de triagem, foram selecionados alguns clones para serem transferidos para placa de 24 cavidades e destes, 16 clones secretaram anticorpos com especificidade para LV-Tcra com reatividade com T-Tso. Dois clones 7 e 33 reconheceram os peptídeos 18 e 14-12kD no blot-Tcra.

PALAVRAS CHAVES: anticorpo monoclonal, *Taenia crassiceps*, *Taenia solium*, reação cruzada, cisticercose.

SUMMARY

The objective of this study was to perform the production of monoclonal antibodies (MAb) using BALB/c mice immunized with *T. crassiceps* (Tcra) antigen for identification of *Taenia solium* (Tso) antigens in human infection.

Both antigens vesicular fluid of Tcra (VF-Tcra) and total of Tso (T-Tso) were submitted to analysis by means of SDS-PAGE: Tso antigen presented several peptides from 8 to 158kD, while VF-Tcra antigen was rich in <20kD peptides.

Female BALB/c mice were divided into seven groups: GI-control; GII immunized with 20µg of VF-Tcra; GIII and GV with 50µg of VF-Tcra; GIV with ~50µg de gel<30kD-Tcra; GVI with 50 µg antigen eluate <30kD-Tcra, and GVII with 50µg of T-Tso, in order to study antibody production kinetic.

IgM, IgG and IgA antibodies were detected by means of ELISA-Tcra, starting on 15th day in serum samples from all groups of mice immunized with Tcra, except from GIV which presented no detectable IgM. On western blot-Tcra (blot-Tcra), these antibodies presented reactivity with <20kD Tcra peptides.

Analysis of cross-reactivity showed that groups anti-Tcra antibodies presented anti-Tso cross-reactivity, with exception of GVI which presented no IgG antibodies; and GIV presented no IgM and IgG antibodies when analyzed on ELISA-Tso. On blot-Tso, anti-Tcra IgM antibodies in samples from GII and GV weakly recognized peptide of 30kD, and peptides 60, 43, 30 and 12kD were reactive in samples from GIV. Samples from all groups of mice, IgG anti-Tcra antibodies identified 12kD peptide of Tso. IgA antibodies in sera from GIII, GIV and GV identified 65, 50, 30 and 12kD peptides of Tso.

Samples from GVII group immunized with T-Tso identified IgM antibodies on ELISA-Tso starting on 5th day, and IgG antibodies starting on 15th day with increasing levels after booster. This group presented high IgA levels in assayed samples. On blot-Tso, IgM antibodies identified peptides of 60, 43, 30, and 12kD, IgG antibodies reacted with 95, 75, 60, 67, 45, 40-35,

25, 18, and 12kD peptides, and IgA antibodies identified peptides of 45 , 40-35, 28-25 and 18kD. These antibodies presented cross-reactivity with Tcra antigen: peptides of 72, 35, 30, 24 and 14kD were identified by IgM antibodies, 95, 70, 50, 30, 18 and 14kD by IgG antibodies, and 70, 37, 35, 30, 18 and 14kD of Tcra by IgA antibodies.

For spleen cells fusion BALB/c mice immunized with VF-Tcra antigen and mieloma cells P₃X₆₃-Ag8.653 were used. After cell fusion 36 IgM-clones and 117 IgG-clones were detected. These clones specifically reacted with Tcra antigen. It was also detected 40 IgM-clones and 10 IgG-clones which recognized Tso antigen. By immunoblotting, two clones identified 8-14 and 18kD peptides of VF-Tcra.

Keywords: Monoclonal antibodies; *Taenia crassiceps*; *Taenia solium*; cross-reactivity; cysticercosis.

INTRODUÇÃO

1 - Anticorpos Monoclonais

Em 1975, KÖHLER & MILSTEIN mostraram que células produtoras de anticorpos podiam ser imortalizadas quando fundidas com células de mieloma. As células híbridas formadas apresentavam a propriedade de secretar anticorpos com especificidade para um determinado antígeno, com proliferação ilimitada. A partir dessas observações, esses pesquisadores publicaram o primeiro método de produção de anticorpos monoclonais (MAb) e de manutenção dos clones produtores.

Ao contrário do anticorpo monoclonal, o soro policlonal contém anticorpos com múltiplas especificidades para diferentes epítomos antigênicos (KÖHLER, 1984). Essa multiplicidade dificulta os estudos imunoquímicos, em função das características da diversidade e heterogeneidade dos anticorpos produzidos.

A obtenção e purificação de anticorpos em grande quantidade, com especificidade definida para estudos imunoquímicos, só pode ser obtida com êxito a partir do desenvolvimento das técnicas de obtenção de hibridomas. Os anticorpos secretados por um determinado clone de célula híbrida são idênticos quanto à especificidade do sítio combinatório para um determinado epítopo (SECHER, 1980; MINER et al., 1983), mantendo uniforme as características biológicas e propriedades da interação antígeno-anticorpo.

Pode-se, então, definir MAbs como anticorpos obtidos de um único clone de linfócito B (ALBERTS. et al., 1994), ao contrário do soro policlonal que é constituído de um conjunto múltiplo e diverso de anticorpos produzidos pelos linfócitos B envolvidos nessa resposta, após um estímulo antigênico.

Diferentes hibridomas estão juntos após a fusão, por isso há necessidade de separá-los individualmente (GROTH & SCHEIDEGGER, 1980), obtendo-se assim o clone híbrido secretor de MABs e com imortalidade em cultura de células. Além disso, é necessário caracterizar cada clone quanto ao isótipo dos anticorpos produzidos, bem como a especificidade do Mab, visando a escolha da célula híbrida de interesse para aplicação no propósito desejado.

A grande vantagem dessa técnica é a imortalidade das células híbridas associada a sua alta proliferação em meio de cultura ou ascite peritoneal em modelo animal, que possibilita obter maiores quantidades de anticorpos para o desenvolvimento experimental da pesquisa (MINER et al., 1983). Essa característica é herdada da célula de mieloma no processo de fusão celular.

A técnica de obtenção de hibridomas estáveis com especificidade para um epítipo do antígeno é difícil e exige criteriosa escolha no preparo do antígeno e esquema de imunização, seleção e manutenção das células de mieloma, sucesso na obtenção de células esplênicas de camundongos hiperimunes, fusão celular para obtenção de clones híbridos linfócito B-mieloma e separação e manutenção dos hibridomas de interesse.

2 - Aplicação dos Anticorpos Monoclonais

A partir do momento em que foram obtidas as primeiras células híbridas, sua produção foi direcionada ao estudo de diversas patologias. A partir de 1980 tem-se utilizado MABs como ferramenta na identificação de estruturas protéicas, testes de identificação de antígenos de histocompatibilidade, técnicas de purificação de moléculas por cromatografia de afinidade, no diagnóstico clínico como: na pesquisa de antígenos tumorais, classificação de tumores, imunoterapia, diagnóstico de doenças parasitárias, virais e microbianas, neuroquímica e embriologia e, também, na identificação de diferentes moléculas de superfície celular (McMICHAEL &

FABER, 1982). Em 1980 já era observada na literatura a utilização de MAb's no diagnóstico clínico, podendo-se citar a investigação de lupus eritematoso sistêmico e da artrite reumatóide (HALLA et al., 1980) e na identificação de linfomas malignos (PIZZOLO et al., 1980). Desde então, o emprego dos MAb's tornou-se cada vez maior.

São muitos os relatos existentes na literatura mostrando a importância dessa ferramenta em diferentes áreas de estudos, como por exemplo, na pesquisa de doenças causadas por bactérias (NORGARD et al., 1984; RUSSEL et al., 1990; DE-GASPARI et al., 1994), vírus (YAMAMOTO et al., 1990) e parasitas (BOSOMPEM et al., 1997), na identificação de carcinomas (LUNDY et al., 1986; LANE et al., 1993; BAARS et al., 1994; ZWAS et al., 1995) e na pesquisa e quantificação de hormônios (HOUSTON et al., 1990; VIEIRA et al., 1995).

MAb's obtidos após fusão de linfócitos B ativados por peptídeos sintéticos têm sido também utilizados no diagnóstico de doenças (LAVERDA & BYRNE, 1997; REIS et al., 1997). Esses anticorpos podem ser aplicados na detecção de antígenos circulantes em algumas patologias (BIBB et al., 1984; MALERGUE & CHUNGUE, 1995; NIBBELING et al., 1998), assim como na caracterização de antígenos alergênicos (PENG et al., 1998). Agentes etiológicos que afetam animais também podem ser estudados empregando-se MAb's (MALGOR et al., 1997).

Além de sua grande utilidade na área diagnóstica, os MAb's têm sido empregados nas tentativas de imunização passiva (SMITH et al., 1982; CHIBA et al., 1997) e na purificação de peptídeos sintéticos (LAVERDA & BYRNE, 1997).

Os MAb's podem ser aplicados em diferentes ensaios utilizando tipos de amostras biológicas, tais como: líquido pleural (HALLA et al., 1980), saliva (ICHIHARA et al., 1993), expectorado pulmonar, secreção faríngea (OLDACH et al., 1993), urina, leite materno (MELEGOS et al., 1996), líquido cefalorraquiano, soro (CHYE et al., 1997), fezes (KONNO et al., 1977), tecidos, medula óssea (GOLDSTEIN et al., 1982) e material de biópsias (PARHAM et al., 1995).

3 - Resposta Imune Humoral

3.1 - Antígenos

A resposta imune pode ser produzida contra uma ampla variedade de moléculas, dependendo de sua composição química, complexidade e de seu reconhecimento como substância estranha ao organismo imunizado.

As substâncias mais imunogênicas são as proteínas por serem complexas no tamanho e na composição química e, como regra geral, quanto maior for a molécula antigênica, maior número de epítomos será apresentado ao sistema imune; conseqüentemente, a possibilidade de existirem receptores para alguns desses determinantes antigênicos nos linfócitos será maior. As proteínas representam, ainda, importante e principal constituinte dos organismos. Os polissacarídeos também atuam como imunógeno, porém com menor eficiência. Já os lipídeos, esteróides, peptídeos sintéticos e ácidos nucleicos são fracos imunógenos, a menos que estejam associados com um carreador protéico (STITES et al., 1994).

A imunogenicidade não depende apenas da natureza fisicoquímica de uma substância. Há ainda outros fatores, tais como: via de imunização, espécie de animal (STITES et al., 1994) e características genéticas individuais, cujos genes localizados no complexo de histocompatibilidade principal são os mais bem estudados na resposta imune (CALICH & VAZ, 1989).

A quantidade de proteínas para imunização é muito diversificada, variando de 1 até 500µg e depende do grau de purificação e da imunogenicidade da proteína (HARLOW & LANE, 1988). Os antígenos na forma particulada são geralmente eficientes imunógenos por estarem na forma insolúvel, facilitando a fagocitose e processo inflamatório e, essa condição de maior retenção no organismo, favorece a apresentação do antígeno aos linfócitos.

3.2 - Adjuvantes

Uma forma de aumentar o tempo de retenção do antígeno e de aumentar a resposta inflamatória consiste em administra-lo em misturas com adjuvantes, que têm a propriedade de aumentar o poder imunógeno do antígeno (DUPUIS et al., 1998). O adjuvante completo de Freund (ACF), o mais utilizado em imunização experimental apresenta uma eficiência elevada. Nele estão incorporados dois componentes: o óleo cuja função é retardar a distribuição e a dispersão do antígeno, além de protegê-lo do catabolismo enzimático; outro componente é constituído por bactérias mortas (*Bordetella pertussis* ou *Mycobacterium tuberculosis*), as quais promovem aumento da resposta imune celular e humoral (GUPTA et al., 1993). Protocolos bem definidos de imunização recomendam o uso de ACF apenas na primeira dose de imunização pela intensidade da resposta inflamatória induzida. Já o adjuvante incompleto (AIF), é indicado nas doses subsequentes ("booster"), que pela ausência de microrganismos na sua composição (BERZOFKY et al., 1993; GUPTA & SIBER, 1995), evita a hiperplasia dos órgãos linfáticos dos animais, observada de maneira acentuada com a administração do ACF, e que tem como consequência, muitas vezes a necrose tecidual grave.

Alguns sais minerais tais como hidróxido e fosfato de alumínio podem ser utilizados como adjuvantes (WETZLER et al., 1988) por precipitar o antígeno, facilitando a fagocitose. Estes compostos são menos eficientes que ACF e AIF, mas não induzem a mesma intensidade de lesões teciduais indesejadas. O efeito do ACF é muito intenso (KEARNEY et al., 1979) e sua utilização no homem pode levar à rejeição de enxertos de pele, formação de tumor, plasmocitose e artrite; e nesse caso o hidróxido de alumínio é o de escolha, sendo o único adjuvante licenciado para uso humano (AUDIBERT & LISE, 1993). No entanto, o fosfato de cálcio e a emulsão de óleo também têm sido utilizados (GUPTA & SIBER, 1995).

Substâncias tensoativas, extratos bacterianos, polirribonucleotídeos, extratos tímicos e levamisole são imunoestimulantes e, também, podem ser

administrados concomitantemente para auxiliar na ativação da resposta imune contra o antígeno específico. Outras substâncias, tais como lipopolissacáride (LPS) e copolímeros não iônicos têm-se mostrado eficientes como adjuvantes (AUDIBERT & LISE, 1993). Têm sido também utilizados lipossomas (TAN & GREGORIADIS, 1988), vitamina A (FRIEDMAN, 1991), saponinas (GÓMEZ et al., 1998) e ISCOM. Este último componente é um complexo imunoestimulante formado por saponinas, colesterol e antígeno anfipático (CLAASSEN & OSTERHAUS, 1992).

Diferentes citocinas podem ser utilizadas como imunoestimuladoras do sistema imune, incluindo interleucina-1, interleucina-2, interferon e fator de necrose tumoral (McCUNE & MARQUIZ, 1990; HEATH & PLAYFAIR, 1992; SCHIJNS et al., 1994). Recentemente, outras substâncias têm sido estudadas como adjuvantes, incluindo toxina B colérica (WU & RUSSEL, 1998), lipídeo A (STEERE et al., 1998) ou associação deste com sais de alumínio (THOELEN et al., 1998).

A utilização de adjuvantes nem sempre é necessária, como nos caso de antígenos acoplados a micropérolas, particulados ou aderidos a nitrocelulose (NILSSON, et al., 1987).

3.3 - Escolha dos Animais para Imunização e Obtenção de Mielomas

O sucesso da indução de uma eficiente resposta imune contra um determinado antígeno "in vivo" depende da espécie e linhagem de animal a ser utilizada na imunização, assim como a obtenção das células de mielomas depende dos animais utilizados (SPITZ et al., 1984).

Para produção de MAbs os animais de escolha têm sido ratos e camundongos. BALB/c é o camundongo de escolha por ser capaz de produzir células de mielomas apropriadas à fusão com esplenócitos retirados de animais de mesma linhagem. Esta condição favorece a obtenção de hibridomas que proliferam em grande quantidade em meios de cultura ou no ascite peritoneal em modelo animal. Já a fusão de células de mieloma de BALB/c com células esplênicas obtidas de outra linhagem, como por

exemplo C57BLACK, também dão origem a células híbridas, no entanto não se desenvolvem tão bem. Camundongos SJL também respondem bem após a inoculação com antígeno, no entanto apresentam dificuldade em produzir híbridos ativos. Ratos produzem grande quantidade de ascite, porém com baixa produção de anticorpos IgG, tornando difícil sua purificação por meio de proteína A (LEDBETTER & HERZENBERG, 1979).

Camundongos BALB/c com 6 semanas de idade já apresentam o timo maturo, e a utilização de fêmeas deve-se ao fato destas serem consideradas mais fáceis de manusear. Embora sejam isogênicos, os camundongos podem responder diferentemente para a mesma preparação antigênica em função de variações de protocolos experimentais. Desta forma, o ideal é imunizar mais de um animal com o antígeno de escolha e selecionar os de melhor resposta.

3.4 - Esquema de Imunização

De acordo com GODING, 1980, a imunização tem duas funções na técnica de obtenção de MABs: uma é a expansão das células híbridas e a outra é obtenção dos esplenócitos ativados. A expansão das células híbridas tem como propósito a obtenção de maior quantidade de MABs. Quando o objetivo é obtenção de células esplênicas, múltiplas doses de antígenos durante algumas semanas e uma dose do antígeno pela via intravenosa (EV) três dias antes da fusão, são consideradas necessárias e importantes (LI, et al., 1991). O “booster” é dado com o propósito de induzir uma forte resposta e sincronizar a maturação das células B. É bem provável que quando há um sincronismo das respostas T e B um número maior de linfócitos antígeno-específico esteja nos tecidos linfóides no dia da fusão celular (GODING, 1980).

O melhor momento para a fusão parece ser nos 3 a 4 dias após o “booster” final (Oi et al., 1978). A partir de 7 a 8 dias do “booster” é reduzido o número de células híbridas formadas durante a fusão (GODING, 1980).

A determinação da dose de imunógeno a ser administrada no esquema de imunização também é importante. Deve-se considerar como dose ideal, a quantidade de antígeno capaz de induzir uma boa resposta imune. Muitos antígenos são catabolizados antes de induzir a formação de células esplênicas ativadas. A eficiência da resposta varia com os fatores do hospedeiro, a via de imunização, o uso de adjuvante e a natureza do antígeno. Para a imunização de camundongos, recomenda-se uma quantidade entre 5 a 50µg de proteínas solúveis emulsificadas em ACF por dose. O "booster" pode ser dado com a mesma dose, no entanto o tradicional é aplicar o dobro ou o triplo da dose inicial em AIF. Em alguns casos, uma pequena dose no início da imunização seguida de uma maior no "booster" tem se mostrado eficiente na produção de anticorpos (HARLOW & LANE, 1988).

Antes de se inocular o antígeno deve-se escolher a via de administração ideal, de acordo com a preparação antigênica a ser utilizada. Uma das formas de administração é pela via intraperitoneal (IP) (YAMANAKA et al., 1992), sendo a mais utilizada por possibilitar a inoculação de grandes volumes, além de não atingir diretamente o sistema sangüíneo. Outra via de inoculação do antígeno é a subcutânea (SC) que tem sido usada com sucesso (KARIM et al., 1996), apesar do volume aplicado ser limitado e menor.

A via EV também tem sido utilizada (DE LEIJ et al., 1983) e é recomendada no "booster" final e sem a utilização de adjuvantes, pois tal associação pode induzir uma resposta exacerbada do sistema imune, podendo resultar em choque reacional. Quando há necessidade de aplicar grandes volumes, a via EV deve ser evitada, para impedir embolia e conseqüentemente a morte do animal. Caso não seja possível administrar o antígeno pela via EV na última dose, a opção é realizar por via IP 5 dias antes da fusão (HARLOW & LANE, 1988). Outra forma de inocular o antígeno é diretamente no órgão linfóide, porém sem o uso de adjuvante, pois pode causar abscessos, granulomas ou úlceras graves (NILSSON et al., 1987).

3.5 - Caracterização dos Soros Policlonais

Para obtenção dos esplenócitos ativados há necessidade da realização de estudo prévio da resposta imune do camundongo contra o imunógeno e seus constituintes antigênicos, por meio de testes imunoquímicos.

A cinética da produção de anticorpos é avaliada por meio do título de anticorpos e do isótipo de imunoglobulina produzido. Os resultados dos testes imunológicos utilizando os anticorpos policlonais, obtidos dos animais imunizados, permitem escolher o melhor esquema de imunização a ser utilizado para obtenção das células esplênicas, assim como para determinar o dia em que devem ser retirados os esplenócitos para a fusão celular.

Geralmente as amostras de sangue são coletadas 7 a 14 dias após a primeira dose de antígeno seguida de várias coletas subseqüentes durante o curso da imunização, cujo número depende do protocolo utilizado (DE GASPARI et al., 1990).

Este estudo, também, permite correlacionar a produção de anticorpos e suas características imunoquímicas obtidas em animal com a resposta imune humoral em humanos.

De acordo com POTTER, 1983, camundongos BALB/c com 2 meses de idade apresentam imunoglobulinas IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, sendo que as IgM séricas apresentam 5 unidades monoméricas (estrutura pentamérica), meia vida de 0,5 dia e concentração normal de 200µg/mL. Já as IgG possuem estrutura monomérica, com meia vida de 2,5 a 4 dias. Estes anticorpos são divididos em 4 subclasses: IgG1 (concentração normal de 900µg/mL), IgG2a (concentração normal de 400µg/mL), IgG2b (concentração normal de 200µg/mL) e as IgG3 estão em baixo nível no soro desses animais, por isso sua concentração é difícil de ser determinada. IgA é constituída de estrutura monomérica, dimérica ou trimérica, com meia vida de 1,3 dias e concentração normal de 450µg/mL. IgE apresenta estrutura dimérica, e sua baixa concentração no soro (0,04 a 6µg/mL) torna difícil a determinação da meia vida. IgD é constituída de estrutura monomérica ou

dimérica e a baixa quantidade no soro também dificulta a determinação de sua meia vida e concentração sérica.

4 - Produção dos Híbridomas

4.1 - Células Esplênicas

As células obtidas dos camundongos imunizados têm a propriedade de produzir anticorpos, no entanto, estas não sobrevivem em meio de cultura por muito tempo.

O estudo da cinética de produção dos anticorpos policlonais define quando deve ser dado o "booster" final e conseqüentemente o dia da obtenção das células esplênicas do animal imunizado, ou seja, o dia da fusão celular (SPITZ, 1986). A retirada do baço deve ser feita em condições assépticas e exige posteriores lavagens em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB) para eliminar alguns possíveis contaminantes. O desprendimento das células é feito por maceração do baço. Após a centrifugação das células em meio de cultura, o sedimento obtido é constituído de esplenócitos. É considerado bem sucedido o procedimento que possibilite obter 10^7 a 10^8 esplenócitos por camundongo.

A fusão celular pode ser feita utilizando esplenócitos de um animal estimulado "in vitro", após sua imortalização em cultura, ou os esplenócitos podem até mesmo ser obtidos após a inoculação de um antígeno em um animal. Para esta mesma finalidade podemos utilizar linfócitos estimulados "in vivo" por um agente patológico (JAMES & BELL, 1987).

4.2 - Células de Mieloma

As células de mieloma obtidas a partir de tumor induzido por injeção de óleo mineral pela via IP foram obtidas pela primeira vez em BALB/c em 1972 (POTTER et al., 1972) e possuem a característica de se dividir intensamente em meio de cultura ou ascite peritoneal.

Nem todas as células de mieloma originadas de camundongos são apropriadas à fusão celular. As células Sp2/0 e PX63-Ag-8.653 não secretam imunoglobulinas e são descendentes da MOPC-21 obtida de BALB/c (ERB & HAU, 1994), sendo por isso as de escolha e de uso comum na fusão celular (PICKERING & GELDER, 1982).

Células de mieloma humano também foram utilizadas para obter hibridomas e hetero-hibridomas (ABRAMS et al., 1983).

As células de mieloma são mantidas congeladas em nitrogênio líquido a -185°C numa proporção de 2×10^6 a 10^7 células por mL em aproximadamente 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) e 90% de SFB (RICHARDS et al., 1992). O descongelamento das células deve ser feito aproximadamente 6 dias antes da fusão; em seguida as células são lavadas em meio de cultura, ressuspensas em meio apropriado enriquecido com SFB e incubadas a 37°C em ambiente de CO_2 . Para a fusão celular, as células são centrifugadas para se obter aproximadamente 5×10^5 células por mL.

A viabilidade das células utilizadas na fusão celular é observada com corantes, sendo o trypan blue o mais usado.

4.3 - Fusão Celular

A fusão celular se dá pela mistura das células de mieloma e células esplênicas em meio de cultura numa proporção ideal de 1:1 a 1:10 (GODING, 1980).

O amplo sucesso na obtenção de hibridomas foi obtido após a utilização de polietilenoglicol (PEG) como substância promotora da fusão

celular, por permitir a redistribuição das proteínas e lipídeos da membrana celular (WOJCIESZYN et al., 1983) e facilitar a formação de células com dois ou mais núcleos. A mitose dá condições de formar cromossomos que são distribuídos nas células filhas. As células formadas podem perder os cromossomos ou até mesmo apresentar cromossomos responsáveis pelo rearranjo das cadeias leves ou pesadas das imunoglobulinas, cuja função é perdida e, conseqüentemente, sem capacidade de produzir anticorpos. Aproximadamente 1% das células conseguem fundir-se e de cada 10^5 células híbridas formadas, apenas uma costuma se multiplicar intensamente e produzir anticorpos (HARLOW & LANE, 1988).

A substância promotora da fusão celular é adicionada posteriormente ao sedimento contendo mistura das células de mieloma e esplenócitos. Têm sido também utilizadas partículas inativadas de vírus Sendai com essa propriedade (SCWABER & COHER, 1973). No entanto, o mais comum é o uso de PEG que tem mostrado bons resultados (LANE, 1985). Há necessidade de estabelecer a quantidade ideal de PEG, uma vez que em concentrações acima de 50% há ação tóxica para as células e abaixo de 30% a fusão é reduzida (GODING, 1980). Após a fusão, o PEG é removido por lavagem e as células são ressuspensas em meio enriquecido com SFB e drogas seletivas, sendo em seguida distribuídas em placas e incubadas a 37°C em ambiente com CO₂.

A seleção dos hibridomas é feita pela adição de aminopterina, hipoxantina e timidina (HAT), 8-azoguanina ou tioguanina, sendo que determinados tipos de mielomas podem apresentar resistência para uma ou mais dessas drogas (ABRAMS et al., 1983; SEKEYOVÁ et al., 1995). A aminopterina atua inibindo a desidrogenase redutase e bloqueia a formação de purina, pirimidina e glicina impedindo a formação de DNA, levando as células a utilizarem a via alternativa "salvage" para transformar a hipoxantina e a guanina através da enzima hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) ou da timidina pela timidina kinase (TK) em DNA. As células de mieloma apresentam uma mutação em uma ou ambas as enzimas e não conseguem sintetizar DNA através da via alternativa. As células híbridas que conseguem

adquirir essas enzimas dos linfócitos B não morrem. Por outro lado, os esplenócitos não sobrevivem em meio de cultura por muito tempo, restando somente os híbridos. Algumas células de mieloma que apresentam mutação na HPRT podem morrer devido à incorporação de 8-azoguanina ou tioguanina no DNA que é tóxico à célula (BERZOFSKY et al., 1993; ERB & HAU, 1994).

Alguns pesquisadores preferem incluir o uso de "feed layer", preparado no mesmo dia ou um dia antes, com esplenócitos, macrófagos, timócitos e fibroblastos de camundongos como fonte de fatores de crescimento, que ajudam as células híbridas a sobreviver e se multiplicar (ERB & HAU, 1994).

Os hibridomas originados de células esplênicas e mielomas de camundongos são os mais comumente obtidos, ao contrário de hibridomas de células humanas que apresentam menor estabilidade e podem não secretar imunoglobulinas em função de defeitos na regulação dos genes, falhas na síntese ou no mecanismo de secreção dos anticorpos (JAMES & BELL, 1987). Uma outra causa da baixa estabilidade dos hibridomas é a maior frequência de obtenção de células híbridas com diferentes cromossomos.

Estudos têm demonstrado que já foram obtidos hetero-hibridomas entre células de camundongos e de gado (COLLINS et al., 1990), células de rato e de BALB/c (LI. et al., 1991), células de camundongos e de cavalo (LUNN et al., 1991), células de camundongos e humanas (COSSIO et al., 1992), células de camundongos e de chimpanzé (ALSMADI & TILLEY, 1998). No entanto os hetero-hibridomas apresentam baixa estabilidade (ERB & HAU, 1994).

5 - Obtenção dos Anticorpos Monoclonais

Se a fusão tiver êxito, microcolônias são observadas nas placas de culturas de células cinco dias após a fusão celular por meio de microscopia,

e entre 10 a 18 dias o crescimento pode ser observado macroscopicamente, permitindo assim o início da triagem das células híbridas produtoras de anticorpos. As classes e subclasses de imunoglobulinas podem ser determinadas por imunodifusão radial (PICKERING & GELDER, 1982), imunofluorescência (KILMARTIN et al., 1982), inibição de hemaglutinação (JEFFERIS et al, 1985) e ELISA (BULLIDO et al., 1997). A caracterização da reatividade e especificidade dos MAb's é avaliada pela técnica de "immunoblotting" (blot) (O'CONNOR & ASHMAAN, 1982), Dot-blot (BEYER, 1984) e ELISA (SAHA & NAIR, 1997).

As cavidades da placa de cultura positivas para anticorpos podem conter múltiplos clones provavelmente originados de células distintas secretando anticorpos de diferentes especificidades, afinidades e características imunoquímicas. Por isso há necessidade de clonar as células híbridas por diluição limitante para separar a célula individualmente (AZMI et al., 1994). Como consequência, há formação de um clone de células idênticas, secretoras de anticorpos de isótipo e especificidade únicos.

A clonagem pode ser feita através da diluição das células de uma cavidade da placa em um determinado volume de meio contendo fatores de crescimento ou "feed layer" (KÖHLER, 1984; BAZIN & LEMIEUX, 1987; ERB & HAU, 1994), com posterior distribuição em placa de 96 cavidades. As cavidades que apresentam crescimento são distribuídas sequencialmente em placas de 24 e de 6 cavidades e posteriormente em garrafas. Outra maneira de clonar é "pescar" uma única célula visualizada através do microscópio e colocá-la em cada uma das cavidades da placa contendo meio. Pode-se, também, fazer a diluição limitante em meio contendo ágar, embora nem todas as células tenham a capacidade de se desenvolver nesse meio.

Após a clonagem, os hibridomas são caracterizados, com o propósito de identificar qual o isótipo de imunoglobulina cada clone produz, para então, selecionar os de interesse na pesquisa destinada. Os mesmos testes utilizados para se fazer a triagem podem ser aplicados para determinar a classe, subclasse e definição dos tipos de cadeias dos MAb's. Uma vez

estabilizados e caracterizados os clones de MAbs, a próxima etapa é a expansão das células, que pode ser feita em meio de cultura (ERB & HAU, 1994) ou, então, por produção de ascite peritoneal em aproximadamente 14 dias após injetar pristane no peritônio do camundongo, que induz as células do sistema imune à liberação de interleucinas, facilitando a produção de MAbs (READING, 1982).

Além desses procedimentos, cada isotipo de imunoglobulina produzido pode ser purificado, empregando-se diferentes técnicas de purificação como: cromatografia de imunoafinidade ou por troca iônica (DEAE-matrix) e a utilização de ácido caprílico (HARLOW & LANE, 1988), gel filtração (DANILOV et al., 1996), precipitação através de sulfato de amônio (CAESAR-TONTHAT & CUTLER, 1997), cromatografia de afinidade com proteína A (LEDBETTER & HERZENBERG, 1979) e concentração com membrana YM30 (CARDOSO et al., 1998).

As células híbridas podem ser criopreservadas a -70°C por até 2 meses ou por longos períodos a -185°C em SFB e DMSO. Estes procedimentos constituem maneiras de armazenar as células, garantindo grande possibilidade de reativá-las posteriormente para secretar anticorpos com especificidade definida (DE LEIJJ et al, 1983; WELLS & PRICE, 1983).

6 – Cisticercose

A cisticercose humana, considerada a mais freqüente e grave das infecções parasitárias do sistema nervoso central (SNC), a neurocisticercose humana (NC), está relacionada ao complexo teníase-cisticercose e constitui um sério problema de Saúde Pública.

O homem é o hospedeiro definitivo do verme adulto, *T. solium*, Este elimina ovos embrionados infectantes, que são disseminados no meio ambiente pelas fezes do hospedeiro. O suíno após a ingestão dos ovos pode desenvolver cisticercos, a forma larvária do parasita. O homem ingerindo a carne suína com parasitas viáveis desenvolve o verme adulto (teníase).

Devido aos maus hábitos de higiene e condições sanitárias deficientes, o homem também pode adquirir cisticercose após ingerir acidentalmente água e alimentos contaminados com ovos embrionados ou, ainda, por auto-infecção quando portador do verme adulto. Em pacientes infectados é comum encontrar a forma larvária no SNC, no globo ocular, tecido subcutâneo e músculos.

A NC é mais freqüente em locais com condições de saneamento básico deficiente e tal situação facilita a disseminação e persistência da parasitose (MAHAJAN, 1982). É uma doença típica de regiões tropicais, com elevada prevalência na América Latina, Europa Oriental, Ásia e África (PAMMENTER et al., 1987). No Brasil é relatada particularmente nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983), embora seja pouco estudada em outros locais.

Os estudos sobre a NC no Brasil são desenvolvidos, na maioria das vezes, em centros de especialização neurológica. Estudos realizados na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) demonstraram que entre 1929 a 1992 a freqüência de NC entre pacientes com distúrbios do SNC foi de 1,6% com aumento nas décadas de 40 a 90 (SPINA-FRANÇA et al., 1993). Entre pacientes internados na Clínica de Neurologia entre 1947 e 1955 a freqüência foi de 3% no Hospital das Clínicas em São Paulo da FMUSP (SPINA-FRANÇA, 1956) e de 7,5% no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983). Estes dados revelam que as medidas profiláticas estão aquém do necessário e a doença continua ainda relacionada ao nível sócio-econômico (SPINA-FRANÇA et al., 1993), embora a contaminação de alimentos e água com ovos possa ocorrer em qualquer situação.

A sintomatologia clínica na NC é causada pela presença do parasita e pelas interações imunológicas parasita-hospedeiro. A doença segue um modelo crônico, com surtos de agudização, quadro meningítico (SPINA-FRANÇA, 1989), convulsões epileptiformes, demência global progressiva, hipertensão intracraniana, vasculites e edema cerebral (SOTELO, et

al.,1985). Esses sintomas geralmente surgem após a exacerbação da resposta imune, após a morte e degeneração do parasita com liberação maciça de componentes imunogênicos. A sintomatologia pode ser variada, dificultando o diagnóstico etiológico.

O diagnóstico da NC é auxiliado por meio de exames de imagem (tomografia e ressonância magnética) e análise do líquido cefalorraquiano (LCR) (LIVRAMENTO et al., 1993). O exame de tomografia pode detectar vesículas em diferentes fases de degeneração (MACHADO, 1987) e quando associado ao exame do LCR torna possível o direcionamento do diagnóstico confirmatório (SOTELO et al., 1985). No entanto, devido ao alto custo, torna impossível sua aplicação em centros de saúde, principalmente nas regiões de baixa condição econômica, que coincidentemente correspondem aos focos da doença. Nesse caso, a análise laboratorial do LCR seria mais apropriada pelo fato de também ser um exame especializado, além de ser menos dispendioso.

A análise dos resultados laboratoriais do LCR é dificultada devido ao polimorfismo da NC, pois cada portador pode desenvolver um curso próprio da doença que depende da resposta imune (NUSSENZWEIG, 1982), da severidade da infecção, da localização dos cistos e do número de lesões (SOTELO et al., 1985; MACHADO et al., 1990).

Diferentes exames podem ser feitos no LCR para melhor esclarecimento da doença, incluindo-se: aspecto, cor, citomorfologia, concentração protéica total, glicose, eletroforese de proteínas e ensaios para detecção de anticorpos específicos (MACHADO, 1987). Nos exames laboratoriais destaca-se a detecção de anticorpos em LCR, que aparecem em maior concentração nos episódios de agudização e exacerbação dos sintomas.

Testes imunológicos utilizando antígenos de Tso para detectar anticorpos anti-Tso em LCR e/ou soro de pacientes com NC (GOTTSTEIN et al., 1986; TSANG et al., 1989; PLANCARTE et al., 1994) têm demonstrado bons resultados e são aplicados inclusive em saliva (ACOSTA, 1990; FELDMAN et al., 1990).

A pesquisa de anticorpos no LCR é bem estudada e testes com alta sensibilidade têm sido descritos (VAZ et al., 1997a). Contudo permanece, ainda, como área de investigação, a padronização de métodos eficientes para a pesquisa de antígenos liberados pelos cisticercos durante sua fase ativa, pois estes podem ser detectados antes do aparecimento dos anticorpos, podendo constituir um marcador precoce e também contribuir para melhor compreensão da imunopatologia da NC.

Diferentes técnicas incluindo dot-ELISA, ELISA, blot, aglutinação de látex, utilizando anticorpos policlonais têm sido aplicadas em soro ou LCR para pesquisa de antígenos circulantes na NC, com resultados variáveis no diagnóstico da NC (ESTRADA & KUHN, 1985; ESTRADA et al., 1989; TELLEZ-GIRON et al., 1989; VALESCO-CASTREJÓN et al., 1989; CHOROMANSKI et al., 1990).

A utilização de MAb's com definida especificidade, como uma potente ferramenta na pesquisa de antígenos na cisticercose humana e suína, parece ser um desafio pelos poucos relatos existentes na literatura. Anticorpos monoclonais anti-Tso têm sido utilizados para identificar antígenos no LCR de paciente com NC (CHANG-YUAN et al., 1992), ovos de Tso em paciente com teníase (MONTENEGRO & MIRANDA, 1996), antígenos de Tso e de *T. saginata* obtidos em hamsters com teníase, infectados experimentalmente (AMBROSIO et al., 1997) ou para purificar antígenos de Tso obtidos de suíno (NASCIMENTO et al., 1987). Anticorpos monoclonais anti-*T. saginata* reconheceram cruzadamente antígeno de Tso em soro ou LCR de portadores de NC (CORREA et al., 1989b; HARRISON et al., 1989).

Há também poucos relatos de utilização de MAb's no estudo da cisticercose animal. A aplicação de MAb's anti-*T. saginata* na identificação de antígenos de Tso em soro de suíno (RODRIGUES-DELL-ROSAL et al., 1989; DRAELANTS et al., 1995) e de antígeno de *T. saginata* em soro de bovino (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992; DRAELANTS et al., 1995; KERCKHOVEN et al., 1998) tem sido relatada.

Tem sido rara a aplicação de MAb's para o diagnóstico de outras

helminthoses humanas. Anticorpos monoclonais anti-*Echinococcus granulosus* foram utilizados para identificar antígenos circulantes em soro de humanos com hidatidose (LIU et al., 1992), bem como para identificar antígenos de cisto hidático de carneiros e antígenos obtidos de ovos de *T. pisiformes* em cães (LIU et al., 1993).

Baseado nos relatos de menor sensibilidade de testes sorológicos utilizando anticorpos policlonais, quando comparado com os que empregam MAb's (CORREIA et al., 1989a,b), toma-se estimulante a tentativa de produzir MAb's contra cisticercos com o intuito de efetuar pesquisa de antígeno na cisticercose.

A principal dificuldade no estudo da NC é a obtenção de preparações antigênicas a partir de cisticercos de Tso de suínos com infecção natural, além das dificuldades em obter preparações homogêneas em diferentes lotes de antígenos e, também, a não garantia de quantidade suficiente para estudos imunoquímicos.

A possibilidade de emprego de antígenos de fonte alternativa surgiu a partir das observações de reatividade cruzada entre os cestodas .

A forma adulta de *T. crassiceps*, cestóideo de raposas na Europa, cuja forma larvária, *Cysticercus longicollis*, é encontrada em roedores foi isolada por FREEMAN em 1962. As larvas de Tcra possuem antígenos imunodominantes em comum com o antígeno de Tso responsável pela infecção humana. A manutenção deste modelo em laboratório, como fonte alternativa de antígeno, vem facilitar os estudos, por permitir a obtenção de lotes mais homogêneos de antígenos (VAZ, 1993; VAZ et al., 1997b).

Estudos realizados por vários autores demonstraram reatividade cruzada entre antígenos de cisticercos de Tcra e anticorpos anti-Tso em suíno com cisticercose (PARKHOUSE & HARRISON, 1987) e entre antígenos de líquido vesicular de Tcra e anticorpos anti-Tso em soro ou LCR de pacientes com NC (KUNZ et al., 1989; LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997a), dados estes que justificam o uso de antígenos heterólogos alternativos no diagnóstico da cisticercose.

O líquido vesicular de Tcra tem sido utilizado como antígeno

alternativo em testes imunológicos para pesquisa de anticorpos no diagnóstico da cisticercose humana. Estes testes mostram a alta frequência em que são identificados peptídeos de baixo peso molecular, caracterizados como imunodominantes (KUNZ et al, 1989; BUENO, 1999).

Quanto aos peptídeos imunodominantes observados na análise de Tso, verificou-se que as amostras de soro de pacientes com cistos no SNC, na fase ativa apresentaram anticorpos anti-Tso reagentes com peptídeos de Tso de baixo peso molecular. Esta característica foi considerada como marcador da fase evolutiva observada na NC (MICHAULT et al., 1990; MICHEL et al., 1990). A reatividade de anticorpos presente em LCR ou soro de pacientes com NC com peptídeos de Tso de baixo peso molecular, observada em diferentes estudos (GOTTSTEIN et al, 1986; GOTTSTEIN et al., 1987; TSANG et al., 1989; MONTENEGRO et al., 1994; YANG et al., 1998), fez com que esses peptídeos fossem considerados como imunodominantes. Ademais, outro estudo verificou que os peptídeos de baixo peso molecular obtidos de líquido vesicular de Tcra induziam proteção contra cisticercose murina, com perspectivas de serem avaliados em estudos sobre vacinas para suínos (VALDEZ et al., 1994).

Outros estudos relatam que o uso de antígenos clonados obtidos de Tcra permitiram a produção de anticorpos policlonais que reconheceram o peptídeo 10kD de LV-Tcra (ZARLENGA et al., 1994) e, também, a identificação de anticorpos no soro ou LCR de pacientes com NC (FISCHER et al., 1994; GERVOKIAN et al., 1996). Os anticorpos policlonais dirigidos contra o antígeno sintético protegeram camundongos contra cisticercose causada por Tcra. Este antígeno poderia ser estudado com a finalidade de produção de vacinas em suínos (MANOUTCHARIAN et al., 1996).

Sabendo da gravidade da NC pela importância desta afecção no SNC aliada à dificuldade em se obter antígenos a partir de suínos com infecção natural, foi objetivo do presente estudo obter MAbs a partir de células esplênicas retiradas de camundongos imunizados com antígenos preparados de larvas de Tcra, que além de fácil obtenção, compartilham antígenos imunodominantes com Tso.

Até o momento não há relatos na literatura sobre a obtenção de MAbs anti-Tcra para o estudo da cisticercose humana.

Os MAbs assim obtidos poderão ser utilizados na pesquisa de antígenos liberados no LCR ou no soro de pacientes com NC já no início da doença, visando um diagnóstico precoce, antes mesmo da produção de anticorpos. Os MAbs obtidos poderão ainda ser empregados na purificação de antígenos por meio de cromatografia de afinidade, resultando na melhoria de preparações antigênicas utilizadas nos ensaios imunodiagnósticos da NC.

OBJETIVO GERAL

Como contribuição aos estudos de diagnóstico da cisticercose humana e suína, bem como de purificação imunoquímica de antígenos obtidos de diferentes cisticercos que compartilham antígenos semelhantes ao de Tcra, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de MABs a partir de camundongos imunizados com antígenos obtidos do modelo experimental (*T. crassiceps*), que identifiquem antígenos presentes na infecção humana (*T. solium*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Caracterização dos antígenos de Tcra e de Tso;
- 2 - Padronização do esquema de imunização de camundongos fêmeas BALB/c com antígenos de Tcra e Tso;
- 3 - Detecção e estudo da cinética de produção de anticorpos anti-Tcra e anti-Tso em soros de camundongos;
- 4 - Determinação da especificidade homóloga e cruzada dos anticorpos policlonais anti-Tcra e anti-Tso;
- 5 - Obtenção de anticorpos monoclonais anti-Tcra;
- 6 - Análise dos anticorpos monoclonais produzidos frente aos antígenos Tcra e Tso e conjugados anti-Ig-total, IgM e IgG;
- 8 - Caracterização de dois clones selecionados após a expansão das células híbridas quanto à especificidade anti-Tcra por blot.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - OBTENÇÃO DE PARASITAS

1.1 - FORMA LARVÁRIA DE *T. crassiceps*

Foi utilizada a cepa ORF de *T. crassiceps*, cedida pelo Dr. Carlos Larralde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autonoma de México, cidade do México, em 1989, e que desde então tem sido mantida em camundongos fêmeas BALB/c adultos.

Em 1962, FREEMAN obteve a cepa ORF após várias inoculações seriadas em camundongos, pela via IP, de reprodução assexuada por brotamento exógenos.

Em camundongos infectados com ovos viáveis de *T. crassiceps*, o embrião migra preferencialmente para o tecido subcutâneo, cavidades pleural e abdominal. No peritônio são encontradas formas com menos de 1mm de diâmetro sem sinais de desenvolvimento de escólex.

As larvas são mantidas pela inoculação intraperitoneal de 5 a 10 vesículas pequenas, sem sinais de brotamento, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, com auxílio de agulha de calibre 25x7mm em 200µl de PBS-I. Aproximadamente 90 dias após a inoculação, os camundongos são sacrificados para obtenção do parasita (vesículas) ou novo grupo de camundongos são reinoculados com 5 a 10 vesículas para manutenção da cepa.

1.2 - FORMA LARVÁRIA DE *T. solium*

Foram obtidas de músculos de suínos naturalmente infectados, provenientes da cidade de Apodi no Rio Grande do Norte. Os criadores desses animais que comercializam a carne mantêm o sistema de criação livre, possibilitando assim o ciclo natural do parasita. As peças de músculos de suínos foram cedidas pelo grupo de pesquisadores sob a coordenação do Professor Adjunto Lêucio Câmara Alves da Universidade Federal de Pernambuco.

2 - PREPARO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS

2.1 - ANTÍGENOS DA FORMA LARVÁRIA DE *T. crassiceps* (Tcra)

2.1.1 - LÍQUIDO VESICULAR (LV-Tcra)

As formas larvárias íntegras de Tcra retiradas de 10 camundongos foram lavadas inicialmente em água destilada e, em seguida, submetidas à lavagem exaustiva com solução salina, descartando-se os parasitas em degeneração e calcificados. As larvas foram rompidas com auxílio de um bastão de vidro, em banho de gelo e submetidas à centrifugação a aproximadamente 16.800xg, durante 10 minutos a 4°C, por duas vezes. Os sobrenadantes obtidos foram misturados e centrifugados a aproximadamente 16.800xg durante 30 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a ultrassom (Ultrasonic Power Unit – MSE, USA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. À suspensão obtida foi adicionado o inibidor de protease “phenilmethylsulphonylfluoride” (PMSF/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), na concentração final de 0,4mM e, então, aliqüotada em frascos e armazenada a -70°C ou liofilizada.

Para imunizar os camundongos do grupo IV foram preparados dois géis (SDS-PAGE) a 12% com antígeno LV-Tcra e, após a corrida eletroforética, o gel foi corado com Coomassie blue e, em seguida, foi cortada, a banda de peso molecular <30kD. As bandas foram desidratadas a 37°C e trituradas em gral e emulsificadas com 4ml de ACF. O antígeno utilizado para imunizar os animais do grupo VI também foi preparado com o mesmo tipo de corrida eletroforética, no entanto a emulsão foi feita com o antígeno eluído em PBS-I da banda de <30 kD obtida do LV-Tcra, v/v em ACF.

2.2 - ANTÍGENOS DA FORMA LARVÁRIA DE *T. solium* (Tso)

2.2.1 - TOTAL (T-Tso)

As larvas foram retiradas dos músculos e vísceras de suínos infectados naturalmente, com o cuidado de não retirar tecidos do hospedeiro. Após várias lavagens sucessivas em solução salina, as larvas foram liofilizadas. Foram obtidos 3,9g de antígeno pulverizado, que em seguida foram triturados em gral, ressuspensos em solução salina e homogeneizados em triturador do tipo Potter em banho de gelo. Em seguida, a mistura foi submetida a ultrassom em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, também em banho de gelo; o extrato, foi a seguir, centrifugado a aproximadamente 16.800xg por 30 minutos a 4°C. Após separar o sobrenadante, o sedimento foi novamente triturado e centrifugado. Os sobrenadantes obtidos na primeira e na segunda etapa foram misturados e submetidos a uma nova centrifugação. Ao sobrenadante final que é constituído de antígeno total foi adicionado PMSF na concentração final de 0,4mM. O antígeno foi distribuído em aliquotas e armazenado a -20°C.

2.2.2 - ESCÓLEX (E-Tso)

O parasita foi dissecado para obtenção do escólex, separado das membranas. Após várias lavagens sucessivas em solução salina, os escólices foram liofilizados, resultando um total de 1,3g de antígeno pulverizado, que foram triturados em gral, ressuspensos em solução salina e homogeneizados em triturador do tipo Potter, em banho de gelo. Em seguida, foram submetidos ao tratamento em ultrassom em 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, também em banho de gelo e a seguir, o extrato foi centrifugado a aproximadamente 16.800xg por 30 minutos a 4°C. Após separar o sobrenadante, o sedimento foi novamente triturado e centrifugado. O sobrenadante obtido nesta segunda etapa foi misturado ao obtido na primeira etapa e após homogeneização foi submetido a uma outra centrifugação. O sobrenadante final que constituiu o antígeno de escólex foi armazenado a -20°C, após a adição de PMSF na concentração final de 0,4mM.

3 - AMOSTRAS DE SOROS E LCR PARA CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

3.1 - SOROS DE COELHO

Soros hiperimunes e controles foram obtidos de 4 coelhos albinos Nova Zelândia de aproximadamente 4 meses de idade. Dois coelhos foram imunizados com antígeno LV-Tcra, um coelho com E-Tso e o outro coelho foi utilizado como controle. Os animais foram imunizados pela via subcutânea na região dorsal. Antes da primeira imunização, foi feita a coleta de sangue para obtenção de soro normal. Todas as sangrias foram feitas pela via EV (veia auricular), exceto a sangria branca, que foi realizada via punção cardíaca. Os coelhos foram imunizados com 250µg dos antígenos LV-Tcra ou E-Tso diluídos em 250µl de solução salina mais 250µl de ACF

(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Quinze dias após a primeira imunização foi colhida as amostras de sangue. Os animais receberam duas doses de reforço com 250µg de antígeno aos 30 e 45 dias após imunização preparados em AIF (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A sangria branca foi feita 45 dias após a primeira imunização.

3.2 - SOROS DE SUÍNOS

Soros positivos foram obtidos de suínos naturalmente infectados com cisticercos nos músculos e vísceras e, como controle negativo, foram utilizados soros coletados de suínos sem a presença desses parasitas. A coleta do sangue foi realizada durante o abate, momento no qual também foram retiradas as larvas para o preparo dos antígenos de Tso. Estas amostras foram cedidas pelo Dr. Paulo Sérgio de Arruda Pinto da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

3.3 - LCR DE PACIENTES COM NC

Amostras de LCR foram obtidas de pacientes com NC, do Hospital das Clínicas da FMUSP (HCFMUSP), sob a coordenação do Professor Adjunto Dr. José Antônio Livramento e Dr. Luís Ramos Machado. Essas amostras fizeram parte do projeto de pesquisa "Avaliação da Resposta Imunológica na NC Humana" da doutoranda Ednéia Casagrande Bueno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, vigentes no HCFMUSP, após parecer favorável do Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da diretoria clínica do mesmo HCFMUSP emitido em 17/07/97, obedecendo ao protocolo de pesquisa nº 072/97, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (BR, 1996).

4 - CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

4.1 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

4.2 - SDS - PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi executada para caracterizar a composição peptídica dos extratos antigênicos utilizados em nossos estudos e para preparar as membranas para o ensaio de blot.

Os antígenos foram caracterizados pela coloração de Coomassie blue e nitrato de prata e pela técnica de blot-lectina para detectar glicoproteínas utilizando lectinas: *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I) e concanavalina (ConA).

4.2.1 - PREPARO DAS PLACAS

Foram utilizadas placas de vidro com dimensões de 9,5cm x 9,5 cm, sobrepostas entre espaçadores de 1mm de espessura, nas extremidades laterais e inferior da placa. Para vedação foi utilizado agarose a 2%, e para aderir a placa na cuba de corrida eletroforética foi utilizada parafina a 2% e vaselina sólida a 50%.

O gel de separação foi preparado em gradiente de 7 - 20%, exceto para o blot de LCR, suíno e blot-lectina, em que foi utilizado gradiente de 5 - 20%. O sistema foi feito através de vasos comunicantes, preparado em solução tamponada Tris-HCl a 1,5M, pH=8,8 e SDS a 0,025%. O gel de empilhamento utilizado foi de 5%, preparado com Tris-HCl a 0,5M, pH=6,8 e SDS a 0,025%.

Após vedar as placas, adicionou-se o gel de separação até uma altura de 5,5cm e acrescentou-se cerca de 1,5cm de água gota a gota. Após aproximadamente 40 minutos, foi obtida a polimerização do gel. Em seguida,

foi retirada a água por inversão, e adicionado o gel de empilhamento até próximo do topo da placa. Foi inserido cuidadosamente o pente que foi retirado após a polimerização.

4.2.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS E DO PADRÃO DE PESO MOLECULAR

Para serem analisados pela coloração por Coomassie blue ou prata, e para o ensaio de blot, antes de aplicados no gel, as preparações antigênicas e o padrão de peso molecular (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, N.J., USA) foram diluídos em solução de Tris-HCl a 25mM, glicina a 25%, SDS a 2%, 2-mercaptoetanol a 14,4mM e bromofenol blue a 0,1%.

As preparações antigênicas de Tcra e Tso obtidas pela técnica de blot-lectina foram tratadas com solução de Tris-HCl a 0,01M, glicerol a 10%, SDS a 1%, 2-mercaptoetanol a 14,4mM e bromofenol blue a 0,1%. Em todas as situações as amostras foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos.

4.2.3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os antígenos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições redutoras, em sistema descontínuo descrito por LAEMMLI, 1970.

Após a polimerização do gel de empilhamento foi removido o espaçador inferior e a placa aderida à cuba de corrida. O tampão de corrida foi adicionado e as amostras foram aplicadas. As corridas eletroforéticas foram feitas em equipamento Bio-Rad (model 200/2.0 – Power Supply, MO, USA), sendo iniciadas a 60V (cerca de 15mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação. Após isso, a voltagem foi aumentada e mantida a 150V (cerca de 30mA) durante aproximadamente 4 horas.

4.3 - MÉTODOS DE COLORAÇÃO

4.3.1 - COOMASSIE BLUE

Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado com solução de metanol a 40% durante 30 minutos a temperatura ambiente e, então, corado com Coomassie Blue-R250 a 0,1% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), a 56°C por 3 minutos e depois descorado com solução de ácido acético a 7% a 56°C. Em seguida, o gel foi enxaguado com várias trocas de água destilada.

4.3.2 - COLORAÇÃO PELA PRATA

A coloração do gel com nitrato de prata foi feita de acordo com TSAI & FRASCH, 1982 com algumas modificações. O gel foi fixado durante 15 a 18 horas em solução contendo etanol a 40% e ácido acético a 5%. O gel foi incubado com solução oxidante (etanol a 40%, ácido acético a 5% e ácido periódico a 0,031M) durante 5 minutos e lavado três vezes durante 15 minutos em água bi-destilada. Em seguida, o gel foi incubado na solução de nitrato de prata durante 10 minutos. Para preparar esta solução, adicionou-se 5mL de nitrato de prata a 20% (gota a gota) a uma solução contendo 2mL hidróxido de amônio a 25% e 14mL de hidróxido de sódio a 0,1N sob agitação, e em seguida foram acrescentados 132mL de água bi-destilada. Foram feitas mais 2 lavagens de 10 minutos em água bi-destilada e, as bandas foram reveladas com solução redutora (ácido cítrico a 0,065mM e 0,25mL de formaldeído a 37% a um volume final de 500mL). Após a coloração, o gel foi lavado duas vezes durante 10 minutos em água bi-destilada. Todo o protocolo técnico foi feito sob agitação, exceto a fixação do gel.

4.4 – WESTERN BLOT

Foi usada a técnica de blot para identificar os peptídeos de reatividade cruzada entre o modelo experimental (*T. crassiceps*) e o modelo da infecção humana (*T. solium*), pela análise dos anticorpos anti-Tcra e anti-Tso presentes nas amostras de soros dos respectivos grupos de camundongos imunizados.

4.4.1 - TRANSFERÊNCIA ELETROFORÉTICA

Após a eletroforese, o gel foi retirado cuidadosamente das placas e submerso inicialmente em tampão de transferência por 15 minutos. Foram utilizadas 12 folhas de papel filtro nº3 (Whatman, England) e uma membrana de nitrocelulose de 0,2 μ (Milipore, USA) mergulhadas em tampão de transferência. Foi feito um sanduíche com 6 papéis-filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 6 papéis-filtro, todos previamente embebidos em tampão de transferência. Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos do gel para membrana de nitrocelulose, segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al., 1979. A transferência foi realizada durante um período de uma hora, a temperatura ambiente, com corrente de 50mA e voltagem constante de 17V (Bio-Rad Trans Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Mo – USA). Em seguida a membrana foi corada com Ponceau-S a 0,5% (Serva Feinbiochemica, GmbH & Co. KG, Alemanha) para verificar a eficiência do procedimento de transferência. Após secagem em estufa a 37°C, a membrana foi armazenada a 4°C vedada entre placas de acrílico.

Para verificar as reações cruzadas entre os anticorpos dos camundongos, empregando-se a técnica de blot, a transferência eletroforética foi feita durante 15 a 18 horas a 4°C utilizando membrana de PVDF 0,45 μ (Hybond - Amersham) previamente tratada com metanol, durante 30 segundos e, em seguida, a membrana e os papéis de filtro foram tratados em tampão de transferência durante 20 minutos.

A membrana de PVDF e o sistema de transferência de 15 a 18 horas foram utilizados devido à dificuldade de detecção de antígenos de Tso em quantidades suficientes na membrana de nitrocelulose. O aumento da capacidade de retenção da membrana de PVDF proporcionou uma melhor resolução dos peptídeos da preparação antigênica, contribuindo para maior reprodutibilidade dos resultados.

4.4.2 - TÉCNICA DE “IMMUNOBLOTTING” (BLOT)

As membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de aproximadamente 3mm de largura e, sob agitação contínua, foram lavadas com solução de Tris/salina (T/S) contendo Tween 20 a 0,05% e bloqueadas durante 2 horas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) em T/S. Foram feitas novas lavagens e adicionado 1ml de soro de coelho ou de suíno diluídos a 1:50 e 1:200 respectivamente e amostras de LCR a 1:2. Após incubação durante 15-18 horas sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens. Foi adicionado 1ml do conjugado específico: Ig-total de cabra anti-IgG de coelho-peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluído a 1:800 (blot com pré-oxidação) e 1:1000 (sem pré-oxidação), conjugado de cabra anti-IgG de suíno-peroxidase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluído a 1:500 e conjugado de cabra anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Cambridge Biotech Corporation, Raritan, N.J., USA) diluído a 1:3000. A reação foi incubada por duas horas, exceto no blot de amostras humanas cuja a incubação da avidina e biotina-peroxidase foi por uma hora cada, intercalado por lavagens. Após novas lavagens, foi adicionado 1ml do substrato [2,5mg de 3, 3'Diaminobenzidina (DAB) Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, mais 75µl de água oxigenada e 15ml de T/S ou 2,5mg de 4-cloro 1-naftol/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, dissolvido em 1,0mL de metanol e 5,0mL de T/S, mais 5µl de água oxigenada]. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água.

No blot feito com lectinas, as membranas de nitrocelulose foram

cortadas em tiras de aproximadamente 3mm de largura e lavadas com PBS-I contendo Tween 20 a 0,05%, sob agitação contínua. Em seguida, foram bloqueadas por 2 horas com PBS-I contendo soro albumina bovina (BSA) a 3%, previamente oxidada com ácido periódico a 10mM dissolvido em acetato de sódio a 0,1M, pH 4,5. Foram feitas novas lavagens e adicionados 800µl das lectinas marcadas com peroxidase: BS-I (específica para galactose) e ConA (específica para glicose e manose) diluídas a 1:200 em PBS-I/BSA. Após incubação por 2 horas a 37°C sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens e adicionado 1ml do substrato DAB preparado de acordo com o protocolo já descrito neste item. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água. No blot-lectina ConA, às soluções de lavagens, de bloqueio e no diluente foram adicionados CaCl₂ a 1mM e MgCl₂ a 1mM. Nas reações controle, por competição com os açúcares específicos, foram adicionados D-galactose e D-glicose, respectivamente, para BS-I e ConA. Foi feito também controle com pré-oxidação das tiras com metaperiodato de sódio a 10mM diluído em carbonato/bicarbonato a 50mM, pH 8,1 por 60 minutos a 37°C. Foi feito o controle da membrana de nitrocelulose, incubado-se as tiras apenas com PBS-I/BSA contendo as lectinas.

Nos blots feitos para identificação dos peptídeos por anticorpos presentes em soro de camundongos, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com PBS-I, sob agitação contínua e bloqueadas durante 2 horas com leite desnatado a 5% em PBS-I. Foram feitas novas lavagens com PBS-I e adicionados 800µl de soro de camundongos diluídos a 1:10 (IgA), 1:100 (IgM) ou 1:500 (IgG e Ig-total). Após incubação durante 15 a 18 horas sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens. Foram adicionados 800µl do conjugado específico de cabra (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA): anti-IgM e anti-IgA de camundongo-peroxidase diluídos a 1:1000, anti-IgG e anti-Ig-total de camundongo-peroxidase diluídos a 1: 2000 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Os conjugados foram incubados por 1 hora e, após novas lavagens, foram adicionados 800µl do substrato DAB preparado de acordo com o protocolo já descrito neste item.

Nos blots para verificar reações cruzadas entre o modelo

experimental (*T. crassiceps*) e o modelo da infecção humana (*T. solium*) e nos blots utilizando antígeno de Tso e soro anti-Tso, as amostras de soro dos camundongos foram diluídas 1:10 e conjugado 1:500. Após a incubação com soro, as membranas de PVDF foram lavadas 3 vezes em PBS-I e 2 vezes com T/S e adicionados 800µl do substrato 4-cloro 1-naftol, preparado de acordo com o protocolo já descrito neste item. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água.

As amostras de soro e LCR, assim como os conjugados foram diluídos em leite desnatado a 1% em PBS-I.

5 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Foram imunizados 6 grupos de camundongos BALB/c fêmeas com antígeno de Tcra ou Tso para verificar se esses antígenos induziam produção de anticorpos nos animais e, assim, avaliar a cinética dos possíveis anticorpos produzidos, com o propósito de selecionar o esquema de imunização que apresentasse melhor resposta para, em seguida, utilizá-los na produção de MAbs.

Para os estudos foram utilizados 39 animais com 7 semanas de idade, distribuídos em 7 grupos. Antes da imunização, os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção do soro normal. Todas as sangrias foram feitas via plexo oftálmico, exceto na sangria final, em que foi utilizado o plexo axilar.

Grupo I: 4 camundongos foram inoculados com 0,2ml de solução salina (controle).

Grupo II: 5 camundongos foram imunizados com 0,2ml de emulsão, preparada com 20µg de antígeno LV-Tcra diluído em 0,1ml de salina e 0,1ml de ACF.

Grupo III: 5 camundongos foram imunizados com 0,2ml de emulsão, preparada com 50µg de antígeno LV-Tcra diluído em 0,1ml de salina e 0,1ml de ACF.

Grupo IV: 10 camundongos foram imunizados com 0,2ml da emulsão preparada com gel contendo a banda de peso molecular <30kD de LV-Tcra (obtido de acordo com o item 2.1.1) e ACF. Como a banda corresponde a cerca de 50% do antígeno total, calcula-se que foram aplicados aproximadamente 50µg de antígeno por camundongo.

Estes animais foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37, 60 e 83 dias após a imunização e formaram os "pool" P₀, P₁₅, P₃₀, P₃₇, P₆₀ e P₈₃. Trinta dias após a primeira dose foi dado um "booster" com o dobro da dose inicial de antígeno emulsificado em AIF.

Grupo V: 5 camundongos foram imunizados com 50µg de antígeno LV-Tcra. Este grupo de animais foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 12, 15 e 32 dias após a imunização e formaram os "pool" P₀, P₅, P₁₂, P₁₅ e P₃₂. O grupo V foi incluído para verificar a cinética do aparecimento de anticorpos IgM, a partir das observações dos resultados dos grupos anteriores.

Grupo VI: 5 camundongos foram imunizados com fração eluída (<30kD)-Tcra (obtido de acordo com o item 2.1.1): a inoculação foi feita com 0,2mL de emulsão v/v antígeno e ACF. Foram utilizadas cerca de 50 µg de proteína por animal.

Grupo VII: 5 camundongos foram inoculados com 50µg de antígeno T-Tso, diluído em 0,1mL de salina e emulsificado em 0,1 mL de ACF.

Os animais dos grupos VI e VII foram sangrados pelo plexo oftálmico antes da inoculação (0) e 5, 15, 30 e 39 dias após imunização, e o mesmo ocorrendo no 44^o dia no grupo VI e 50^o dia no grupo VII. O "booster" foi dado trinta dias após a primeira dose com o dobro da dose inicial de antígeno emulsificado em AIF. As amostras deram origem aos "pool" P₀, P₅, P₁₅, P₃₀, P₃₉, P₄₄ e P₅₀.

Os esquemas de imunização dos diferentes grupos estão demonstrados resumidamente na tabela 1.

TABELA 1 Grupos de animais imunizados e grupo controle e os "pool" de amostras formados de acordo com o dia das coletas dos soros.

Grupos (G)	Nº de animais	Antígenos	"Pool" (P)/dias
GI	4	200 µl salina (controle)	P _{0, 15, 30, 37, 60, 83}
GII	5	20 µg de LV-Tcra	P _{0, 15, 30, 37, 60, 83}
GIII	5	50 µg de LV-Tcra	P _{0, 15, 30, 37, 60, 83}
GIV	10	Gel<30 kD-Tcra (~50 µg)	P _{0, 15, 30, 37, 60, 83}
GV	5	50 µg de LV-Tcra	P _{0, 5, 12, 15, 30, 32}
GVI	5	50 µg antígeno eluato <30kD-Tcra	P _{0, 5, 15, 30, 39, 44}
GVII	5	50 µg T-Tso	P _{0, 5, 15, 30, 39, 50}

6 - CINÉTICA DO APARECIMENTO DE ANTICORPOS ANTI-LV-Tcra E ANTI-T-Tso NO SORO DE CAMUNDONGOS BALB/c

Os sangues obtidos de cada grupo (GI, GII, GIII e GIV) formaram "pool", denominados de PT₀, T₁₅, T₃₀, T₃₇, T₆₀ e T₈₃. Os obtidos no GV formaram os "pool" PT₀, T₅, T₁₂, T₁₅ e T₃₂, e nos GVI e GVII formaram os "pool", denominados de PT₀, T₅, T₁₅, T₃₀ e T₃₉, (e também T₄₄ no GVI e T₅₀ no GVII).

As amostras de sangue de cada grupo foram mantidas a temperatura ambiente por 1 hora e centrifugadas 2 vezes por 5 minutos a aproximadamente 945xg. Após a primeira centrifugação, o coágulo foi apenas deslocado, para então fazer a segunda centrifugação. Os soros foram estocados a -20°C.

7 - "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" (ELISA) PARA VERIFICAR A CINÉTICA DE PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-LV-Tcra E ANTI-T-Tso

7.1 - PADRONIZAÇÃO DO ELISA

Foi padronizado o teste imunoenzimático (ELISA) para acompanhar a produção de anticorpos nos soros dos camundongos imunizados com antígeno LV-Tcra ou T-Tso.

7.2 - TITULAÇÃO DOS CONJUGADOS: SOROS DE CAMUNDONGOS ANTI-Ig-TOTAL, ANTI-IgM, ANTI-IgG E ANTI-IgA MARCADOS COM PEROXIDASE

Inicialmente as placas de microtitulação de 96 cavidades em fundo plano maxisorp (NUNC, Dinamarca) foram sensibilizadas com antígeno LV-Tcra ou T-Tso, na proporção de 1µg em 100µl de tampão carbonato/bicarbonato a 0,5M, pH = 9,6, por cavidade, e posteriormente, incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes por um minuto com solução salina contendo Tween 20 a 0,05%. Em seguida, foi feito o bloqueio durante uma hora distribuindo-se em cada cavidade 150µl de leite desnatado (Molico, Nestlé) a 5% em PBS-II. Foram repetidas as lavagens e, então, adicionados 100µl dos "pool" de soro de camundongos em diluições seriadas na razão 2. Após novas lavagens, foram acrescentados 100µl dos conjugados específicos (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA): soro de cabra anti-Ig-total-camundongo marcado com peroxidase, diluído 1:2500, 1:5000 e 1:7500, soro anti-IgM-camundongo marcado com peroxidase e soro anti-IgG-camundongo marcado com peroxidase, diluídos 1:500, 1:1000 e 1:2000 ou soro anti-IgA-camundongo marcado com peroxidase, diluído 1:1000 e 1:2000; e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e incubadas com 100µl de substrato constituído de 10mg de

orto-fenilenodiamina (OPD/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), 10µl de água oxigenada e 10ml de tampão citrato/fosfato a 0,2M, por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100µl de ácido sulfúrico a 4N. As amostras e conjugados foram diluídos em PBS-II contendo leite a 1% e as incubações foram feitas a 37°C. A leitura da reação foi feita no espectrofotômetro (Multiskan MCC, Flow Lab, USA) em comprimento de onda a 492nm.

8 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM SEPHAROSE 4B-PROTEÍNA A

Para evitar uma reação falso negativa em decorrência da competição dos anticorpos IgG aos determinantes antigênicos, ligando-se preferencialmente e impedindo a ligação dos anticorpos IgA ao antígeno, o “pool” de soro do GIV (PIV₆₀) que apresentou título de 1:1280 no ELISA para os anticorpos IgA, foi purificado em coluna de Sepharose-4B proteína A (Pharmacia LKB, Biotechnology, Piscataway, N.J., USA) para retirar os anticorpos IgG. A cromatografia foi feita segundo MACKENZIE et al., 1978 com algumas modificações. Inicialmente, a amostra foi diluída a 1:100 em solução contendo fosfato de sódio a 20Mm e NaCl a 3M – pH 7,0 e passada na coluna. Em seguida a coluna foi lavada com mesmo tampão por várias vezes no volume de 1mL cada, sendo as densidades ópticas (D.O.) medidas no espectrofotômetro em comprimento de onda 280nm. Em seguida, a fração IgG foi eluída em solução de citrato de sódio a 0,1M – pH 3,0 e as D.O. também foram medidas a 280nm. Os eluatos obtidos deram origem a dois “pool”, correspondentes a cada tampão, que foram concentrados em membrana de diálise e, em seguida dialisados em PBS – pH 8,0.

9 - OBTENÇÃO DE MAbS PELA TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS

9.1 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA OBTENÇÃO DOS MAbS

9.1.1 - ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DE ANIMAIS E OBTENÇÃO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

Em nosso estudo, escolhemos dois camundongos BALB/c imunizados com 50µg de antígeno LV-Tcra para a fusão celular. Sete dias após o “booster” foi dada pela via EV nos animais selecionados uma dose de 100µg desse antígeno, dialisada durante 24 horas e diluída em solução salina. A fusão celular foi feita 3 dias após ser dada esta dose.

Sob condições estéreis, e com o auxílio de tesoura e pinça os baços dos animais foram retirados e colocadas em placas de Petri com 2mL de meio Iscove's (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) sem SFB (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). O desprendimento das células foi feito por maceração do baço entre lâminas, sendo transferidas para um tubo cônico estéril e, após alguns minutos, o sobrenadante da suspensão de células foi transferido para outro tubo. O volume foi então completado para 10mL com meio Iscove's, seguido de centrifugação a aproximadamente 300g durante 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células foram reservadas para a realização da fusão celular.

9.1.2 - OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE MIELOMA

Para obtenção dos MAbS anti-LV-Tcra foram realizados experimentos de fusão celular, utilizando células de mieloma de camundongos P₃X₆₃-Ag8.653, obtidas comercialmente do American Type Culture Collection (ATCC), USA.

9.1.3 - PREPARAÇÕES DAS CÉLULAS DE MIELOMA

As ampolas com células de mielomas foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas em banho maria a 37°C, transferindo-se em seguida para um tubo cônico contendo 15mL de meio Iscove's sem SFB. As células foram lavadas por centrifugação a aproximadamente 300xg durante 10 minutos a temperatura ambiente em meio Iscove's e, em seguida, transferidas para placas de cultura de 24 cavidades, contendo meio Iscove's enriquecido com HEPES a 20mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), glutamina a 2mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e SFB nas concentrações de 10 e 20%. Foram adicionados os antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 50µg/mL e anfotericina a 2,5µg/mL (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). As placas foram incubadas a 37°C em estufas de CO₂ a 5% e, quando se observava um crescimento ótimo, as células foram transferidas para frascos de cultura de células de 50, 100 e 250mL, sequencialmente e mantidas em estufas a 37°C, com 5% de CO₂.

No dia da fusão celular as células foram centrifugadas a aproximadamente 300xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, sendo em seguida descartado o sobrenadante, e as células foram reservadas para a realização da fusão celular.

9.1.4 - PREPARO DO "FEEDER-LAYER" DE MACRÓFAGOS

O "feeder-layer" de macrófagos foi preparado 2 a 3 dias antes do experimento de fusão celular. Camundongos BALB/c não inoculados foram sacrificados e a lavagem intraperitonal foi realizada injetando-se 10mL da solução de sacarose a 0,34M (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) a 4°C por animal. As células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se corante de Turk (proporção corante/célula de 9:1). Adicionou-se meio enriquecido contendo SFB a 10%, ajustando-se para a concentração celular adequada, ou seja, 10⁴ células em 100µl por cavidade das placas de

96 cavidades e 5×10^4 células em 1 mL por cavidade em placas de 24 cavidades.

9.1.5- PROCEDIMENTO DE FUSÃO CELULAR

Para se verificar a viabilidade das células tanto esplênicas como de mieloma, a concentração celular foi ajustada para 2×10^5 células/mL. A viabilidade celular foi determinada por coloração com Trypan Blue. As suspensões celulares apresentaram viabilidade superior a 90%. Foram utilizadas $1,5 \times 10^7$ células de mieloma e $1,5 \times 10^8$ células esplênicas. As células foram misturadas gentilmente em um tubo cônico e centrifugadas a aproximadamente 300xg a temperatura ambiente por 8 minutos, sendo o sobrenadante retirado por aspiração. A mistura celular foi mantida sob agitação suave durante 1,5 minutos a 37°C e, em seguida foi adicionado 0,3mL de polietilenoglicol a 50% (PEG/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). O tubo foi mantido sob agitação suave a 37°C por mais 2 minutos. Em seguida as células foram centrifugadas a aproximadamente 300g por 4 minutos, e na sequência o PEG foi retirado por aspiração. As células foram lavadas em 30 mL de meio Iscove's sem SFB por centrifugação a aproximadamente 300xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 50mL de meio enriquecido contendo SFB a 20%, sendo a seguir, distribuídas em alíquotas de 100µl por cavidade em placas de 96 cavidades, previamente preparadas com "feeder-layer" de macrófagos (protocolo ainda não publicado. DE GASPARI, Seção de imunologia, Instituto Adolfo Lutz).

9.1.6 - IDENTIFICAÇÃO DAS COLÔNIAS FORMADORAS DE ANTICORPOS

A identificação dos clones produtores de anticorpos foi realizada por meio de ELISA de acordo com a metodologia descrita no item 9.2.

9.1.7 - TRANSFERÊNCIA E EXPANSÃO DOS HIBRIDOMAS

A cada 2 dias foi trocado o meio Iscove's enriquecido contendo 10% de SFB e acrescido de hipoxantina a 100 μ M, aminopterina a 4 μ M e timidina a 16 μ M (HAT/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A partir do 8^o dia, as trocas foram feitas com Iscove's enriquecido contendo somente hipoxantina e timidina a 104 μ M (HT/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA).

A triagem por meio de ELISA foi iniciada no 9^o dia após a fusão utilizando-se o conjugado anti-Ig-total-camundongo. No 11^o dia foram feitos novos testes por meio de ELISA com uma das placas selecionadas, utilizando-se conjugado anti-IgM e anti-IgG de camundongo.

Com base nos resultados obtidos foram selecionadas 72 cavidades que continham clones e estes foram transferidos para placas de 24 cavidades, com o propósito de efetuar expansão celular. No 9^o dia após a transferência foi observado o crescimento celular e selecionadas 24 cavidades que continham clones para serem testados por ELISA. Após análise dos resultados foram selecionados 2 clones para fazer análise por meio de blot-T α r. Um clone foi selecionado por ter apresentado maior reatividade no ELISA com antígeno T-Tso e o outro por ter apresentado elevado crescimento celular. Os clones obtidos foram congelados a -70°C com DMSO (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, e SFB (DMSO a 20% acrescido de SFB a 80%).

9.2 - SELEÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS POR ELISA

O ELISA executado para realizar a triagem dos clones produtores de MAbs seguiu a metodologia padronizada para o estudo da cinética de produção de anticorpos, com algumas modificações. O sobrenadante de cultura dos clones, diluído a 1:3 foi incubado durante 15 a 18 horas a 37°C. Os conjugados utilizados foram anti-Ig-total de camundongo marcado com peroxidase diluído a 1:2500, anti-IgM ou IgG de camundongo marcado com

peroxidase diluídos a 1:1000 e incubado por 2 horas. Foram utilizados os substratos OPD preparado de acordo com o protocolo do item 7.2 ou 150µl de tetrametilbenzidina (TMB/Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) a 25mM diluído em DMSO e 2,5µl de água oxigenada em 12,5ml de tampão citrato/fosfato a 0,2M. Após 15 minutos a reação enzimática foi interrompida com adição de 100µl de ácido sulfúrico a 1N ou 4N. A leitura da D.O. foi feita em espectrofotômetro de placas (Multiskan MCC, Flow Lab, USA) em comprimento de onda 450 ou 492nm.

9.3 - CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES POR BLOT

As membranas de nitrocelulose foram lavadas com PBS-I, sob agitação contínua, e bloqueadas durante 2 horas com leite desnatado a 5% em PBS-I. Foram feitas novas lavagens com PBS-I e adicionados 800µl do sobrenadante das células híbridas diluído a 1:3. Após incubação durante 15 a 18 horas, sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens. Foram adicionados 800µl de soro cabra anti-Ig-total-camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) diluído a 1:1000. A reação foi incubada por 2 horas e após novas lavagens, foram adicionados 800µl de substrato [16µl de 5-bromo-4-chloro-3-indol-fosfato a 0,005% (BCIP/Bio-Rad) diluído em DMF, 33µl de nitroblue tetrazolium a 0,005% (NBT/Bio-Rad) diluído em 70% de DMF, 2,5mL de cloreto de magnésio a 2M e de bicarbonato de sódio a 0,2M]. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água destilada.

RESULTADOS

1 - RENDIMENTO DOS ANTÍGENOS OBTIDOS

Na tabela 2 estão apresentadas as quantidades de antígeno obtidas, a concentração e o total de proteínas, bem como o rendimento de antígenos obtidos de Tcra e Tso.

TABELA 2. Volume , concentração ([]) proteica, quantidade total de proteína obtida de cada antígeno e rendimento de proteínas de LV-Tcra e T-Tso obtido por animal inoculado com larvas de Tcra ou o rendimento obtido por grama de larvas de *T. solium* pulverizado dos antígenos T-Tso e E-Tso obtidos de 2 peças de suínos com infecção natural.

Antígeno	Volume (mL)	[] de proteína (mg/mL)	Total de proteína (mg)	Rendimento de proteína
LV-Tcra	220,0	1,4	308,0	30,8mg por camundongo
T-Tso	27,0	6,7	180,9	46,4mg por g (pó) de parasita
E-Tso	14,0	4,1	57,4	44,1mg por g (pó) de parasita

Tcra: *T. crassiceps*

LV-Tcra: antígeno de líquido vesicular de Tcra

Tso: *T. solium*

T-Tso: antígeno total de Tso

E-Tso: antígeno de escólex de Tso

Os resultados mostraram que em 10 camundongos inoculados com larvas de *T. crassiceps* foram obtidas 308mg de proteínas LV-Tcra, o equivale a 30,8mg de proteína por animal. Um total de 180,9mg de proteínas de T-Tso foram obtidas a partir de 3,9 gramas de larvas de *T. solium* pulverizado, o equivalente a 46,4mg de proteínas por grama de pó. Pudemos observar também que 1,2g de antígeno de escólex de *T. solium* pulverizado deram origem a 57,4mg de proteínas de E-Tso, correspondente a 44,1mg de proteína por grama de pó.

2 - CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ANTIGÊNICOS POR SDS-PAGE

A figura 1 mostra o perfil eletroforético dos antígenos LV-Tcra e T-Tso corados pelo Coomassie blue (1; 2) e nitrato de prata (3; 4).

FIGURA 1. SDS-PAGE 7 a 20% dos antígenos T-Tso (1; 3) e LV-Tcra (2; 4), corados pelo Coomassie blue (1; 2) e pela prata (3; 4), aplicados numa quantidade de 5µg/mm. ➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

O antígeno T-Tso apresentou um padrão heterogêneo de peptídeos (fig.1; 1 e 3). Esse antígeno tem aspecto leitoso e necessita ser homogeneizado a cada manipulação. O antígeno LV-Tcra, por sua vez é mais homogêneo e mostra uma maior concentração de peptídeos com peso molecular abaixo de 20kD (fig. 1; 2 e 4). A análise do gel mostra que o método de coloração pelo nitrato de prata (fig. 1; 3 e 4) apresentou uma sensibilidade maior quando comparado ao Coomassie blue (fig. 1; 1 e 2) na caracterização dos antígenos, especialmente no caso de peptídeos de baixo peso molecular. Na coloração pela prata foi observado a presença de peptídeos <20kD no antígeno T-Tso (fig. 1; 3), não sendo observado pela coloração por Coomassie blue (fig. 1; 1).

A figura 2 representa o resultado da coloração por Coomassie blue do antígeno LV-Tcra antes de ser eluído (1; 4) e após a eluição em PBS-I da banda <30 kD (2; 3), utilizado para inocular camundongos do grupo VI.

FIGURA 2. SDS-PAGE 12% do antígeno eluído LV-Tcra em PBS-I, a partir da região <30kD do gel, corados por Coomassie blue. (1; 4) antígeno LV-Tcra antes da eluição e (2; 3) antígeno eluato <30kD-Tcra. Os antígenos foram aplicados na quantidade de 25µg/mm.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

No perfil eletroforético utilizando o eluato <30 kD (LV-Tcra) foram identificados dois peptídeos com massa molecular aparente de 18 e 14 kD (fig. 2; 2 e 3). Essa fração eluída foi utilizada para imunizar os camundongos do grupo VI e avaliar a imunogenicidade destes peptídeos. Este procedimento foi realizado pelo conhecimento em estudos anteriormente realizados sobre o fato dos peptídeos <30kD possuírem alta imunogenicidade.

3 - ANÁLISE DOS ANTÍGENOS LV-Tcra E T-Tso POR BLOT

3.1 – USO DE SORO DE COELHO IMUNE, SORO DE SUÍNO COM CISTICERCOSE, LCR DE PACIENTE COM NC, SORO CONTROLE DE COELHO E DE SUÍNO E LCR CONTROLE NEGATIVO

Na figura 3 está o resultado do blot utilizando soros hiperimunes de coelho e soro controle negativo de coelho (A; B), soros de suíno com cisticercose e soro controle negativo de suíno (C; D) e LCR de paciente com NC e LCR controle negativo (E; F).

FIGURA 3. Resultado do blot utilizando soros hiperimunes de coelho e soro controle negativo (A; B): (1) soro de coelho anti-LV-Tcra, (2) soro de coelho anti-E-Tso e (3) soro controle negativo de coelho. Soro de suínos infectados naturalmente com larvas de Tso e soros controle negativo (C; D): (1; 2) soros controle negativo de suíno e (3; 4) soros de suínos com cisticercose por Tso. LCR de pacientes com NC e LCR controle negativo (E; F): (1/E; 2/E; 3/F e 4/F) LCR controle negativo de paciente, (3/E a 5/E; 1/F e 2/F) LCR de paciente com NC. Os antígenos utilizados foram T-Tso (A; C; E) e LV-Tcra (B; D; F), aplicados na quantidade de 5µg/mm no SDS-PAGE 7-20% (A; B) e 5-20% (C; D; E; F).

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os soros hiperimunes de coelho mostraram a presença de reatividade cruzada entre os antígenos Tcra e Tso. Utilizando soro de coelho contendo anticorpos anti-LV-Tcra verificou-se uma melhor reatividade com os peptídeos de baixo peso molecular de antígeno LV-Tcra (menor que 20kD) (fig. 3-B; 1). Com o antígeno T-Tso foi reconhecido o peptídeo 14kD pelos anticorpos anti-LV-Tcra presente em soro de coelho (fig. 3-A; 1), sendo que esse peptídeo não foi reconhecido pelo soro controle e nem pelo soro anti-E-Tso (fig. 3-A; 2 e 3). Observou-se, ainda, que os peptídeos 95-93 e 88-82 de Tso foram reconhecidos por todas as amostras de soro imune e também por soro normal de coelho (fig. 3-A), e os peptídeos 72 e 54kD de Tso, também, foram reconhecidos pelo soro normal de coelho (fig. 3-A; 3). Esses antígenos, considerados inespecíficos, não foram observados no blot utilizando antígeno LV-Tcra com amostras de soro de coelho (fig. 3-B).

A análise do blot mostrou reatividade homóloga entre anticorpos presentes durante o curso da infecção natural de suínos e antígenos Tso, sendo que diferentes peptídeos de Tso (entre 94 e 25kD) e o 14kD foram reconhecidos por anticorpos presente em soro desses animais (fig. 3-C; 3 e 4). Os anticorpos anti-Tso presentes nos soros de suínos com cisticercose reconheceram cruzadamente diferentes peptídeos entre 94 e 25kD de Tcra, sendo observada uma forte reatividade com o peptídeo 14-12kD de Tcra (fig. 3-D; 3 e 4).

Ao analisar amostras de LCR de pacientes acometidos de NC, observou-se a existência de diferentes padrões de reatividade frente aos antígenos de Tso (fig. 3-E; 3 a 5). Foi verificada a existência de reatividade cruzada entre anticorpos presentes no LCR e antígenos heterólogos, caracterizada pela intensa reatividade com o peptídeo com massa molecular menor que 20kD de antígeno de Tcra (fig. 3-F; 1 e 2). O LCR controle negativo reagiu de forma inespecífica com os peptídeos 68 e 94kD do antígeno LV-Tcra (fig. 3-F; 3 e 4).

3.2 – ANÁLISE DA CONSTITUIÇÃO GLICOPROTÉICA COM PRÉ-OXIDAÇÃO

A figura 4 representa o resultado do blot realizado com amostras de coelho anti-LV-Tcra, soro controle negativo de coelho e LCR de paciente com neurocisticercose após a pré-oxidação das tiras com ácido periódico.

FIGURA 4. Blot com pré-oxidação das tiras com ácido periódico a 50mM e análise de soro de coelho anti-LV-Tcra, soro controle negativo de coelho, LCR de paciente com neurocisticercose. (1) soro de coelho anti-LV-Tcra, (2) soro controle negativo de coelho, (3 a 6) LCR de paciente com neurocisticercose. O antígeno utilizado foi LV-Tcra aplicado na quantidade de 5µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Após oxidação com ácido periódico dos sítios antigênicos glicoprotéicos presente no LV-Tcra foi observada uma menor reatividade dos soros imunes de coelho (fig. 4; 1) e do LCR de pacientes (fig.4; 3 a 6) com esse antígeno, podendo-se observar um aspecto difuso na região <30kD. A redução desta reatividade pode ser explicada pela oxidação, com ácido periódico, de sítios antigênicos glicoprotéicos presente no LV-Tcra.

3.3 - BLOT-LECTINA

O blot da figura 5 representa o resultado da reatividade do antígeno LV-Tcra (A) e T-Tso (B) com lectinas específicas para glicose e manose (ConA) e para galactose (BS-I). Foram também feitos os controles de competição com açúcares e de pré-oxidação.

FIGURA 5. Blot para verificar a reatividade dos peptídeos dos antígenos LV-Tcra (A) e T-Tso (B) com lectinas específicas para glicose e/ou manose (ConA) e para galactose (BS-I) e respectivos controles de competição com açúcares e de pré-oxidação. À esquerda, tira corada com Ponceau-S. (1) controle da nitrocelulose com lectina ConA, (2) controle da nitrocelulose com lectina BS-I, (3) BS-I lectina específica para galactose, (4) lectina BS-I e competição com galactose, (5) pré-oxidação da membrana e reação com lectina específica para galactose (BS-I), (6) ConA lectina específica para glicose e/ou manose, (7) lectina ConA e competição com glicose, (8) pré-oxidação da membrana e reação com lectina específica para glicose e/ ou manose (ConA). Os antígenos utilizados foram de LV-Tcra (A) e T-Tso (B) aplicados na quantidade de 4µg/mm no SDS-PAGE 5-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Pode-se observar que os peptídeos 158, 150, 135, 120, 94, 79, 74, 67, 55-60, 48 e 45 kD de Tcra contêm resíduos de galactose visto serem identificados pela lectina BS-I (fig. 5-A; 3). Foi observado que na reação de competição entre BS-I e galactose não houve reatividade da BS-I com peptídeos de Tcra (fig. 5-A; 4), ou seja, a BS-I interagiu com a galactose e não com o antígeno de Tcra, comprovando assim, que parte do antígeno LV-Tcra é constituído por resíduos de galactose.

A lectina ConA (fig. 5-A; 6) identificou os peptídeos 158, 150, 135, 130, 125, 120, 94 (reação intensa), 79-74, 67, 65-60, 49-51 (reação forte), 48, 43 (reação forte), 37, 33, 20 e 18kD do antígeno LV-Tcra e, com isso, pode-se deduzir que o antígeno é constituído de glicose e/ou manose, pela afinidade da ConA por esses açúcares.

Peptídeos acima de 94kD de Tcra foram identificados pela ConA após a o teste de competição entre essa lectina e glicose (fig. 5-A; 7). Esses peptídeos identificados podem ser constituídos de manose pelo fato dessa lectina também ter afinidade com ConA. No entanto não pode-se afirmar com certeza, por não ter sido feito teste de competição entre ConA e manose.

Não foram identificados peptídeos de Tcra pelas lectinas BS-I (fig. 5-A; 5) e ConA (fig. 5-A; 8) após a oxidação com ácido periódico a 50mM, isso porque o ácido eliminou as interações entre lectinas e glicoproteínas do antígeno, impedindo a ligação das lectinas com o antígeno LV-Tcra, confirmando que os peptídeos reativos com BS-I ou ConA apresentam porções glicídicas.

Observou-se que apenas o peptídeo 120kD do antígeno T-Tso foi reconhecido fracamente pela lectina BS-I (fig. 5-B; 3), permanecendo reativo na reação de competição entre lectina BS-I e galactose (fig. 5-B; 4), indicando que os peptídeos desse antígeno parecem não conter resíduos de galactose.

Os peptídeos 215, 212, 170, 120-116, 94, 79, 76, 65, 54-46, 43, 37, 30 e 20, 14 e 12kD de T-Tso são constituídos de glicose e/ou manose por serem identificados pela ConA (fig. 5-B; 6). Verificou-se que após a competição da

ConA com glicose foram identificados os peptídeos 116, 94 e 54-46KD (fig. 5-B; 7). O ideal seria fazer também teste de competição entre a ConA e manose para verificar se o antígeno é constituído de manose.

Não foram identificados peptídeos de Tso pelas lectinas BS-I (fig. 5-B; 5) e ConA (fig. 5-B; 8) após a oxidação com ácido periódico a 50mM. Pode-se dizer que o ácido eliminou as interações entre lectinas e glicoproteínas do antígeno T-Tso.

4 - PADRONIZAÇÃO DO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS Ig-total, IgM, IgG E IgA EM AMOSTRAS DE CAMUNDONGOS

As amostras dos animais imunizados com antígeno de Tcra e Tso foram empregadas na padronização do ELISA com os antígenos LV-Tcra e T-Tso. Foram feitas avaliações quanto às condições do ensaio, tempo, temperatura, título adequado de reagentes e diluentes.

Os resultados da padronização do ELISA utilizando amostras de camundongos imunizados com Tcra, antígenos T-Tcra e T-Tso e conjugados específicos permitiu selecionar o título adequado de uso de conjugado anti-Ig-total na diluição de 1:5000, anti-IgM e IgG 1:2000 e anti-IgA 1:1000 para determinar a cinética dos anticorpos anti-Tcra ou anti-Tso (resultados não mostrados).

5 - CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/C IMUNIZADOS COM ANTÍGENOS DE CISTICERCOS (LV-Tcra E T-Tso)

A cinética de produção dos anticorpos foi determinada por ELISA, utilizando antígeno de Tcra e Tso para detecção de anticorpos Ig-total, IgM, IgG e IgA nos "pool" de soros obtidos de diferentes grupos de camundongos imunizados com antígenos LV-Tcra e T-Tso e grupo controle, de acordo com os dias de coleta das amostras de sangue. O ELISA foi feito para verificar a produção de anticorpos Ig-total, IgM, IgG e IgA de reatividade cruzada entre antígenos de T-Tso e LV-Tcra, com as amostras de imunização heteróloga, respectivamente anti-Tcra e anti-Tso.

5.1 - REATIVIDADE HOMÓLOGA COM ANTÍGENO LV-Tcra

A figura 6 representa os títulos de Ig-total, IgM, IgG e IgA em amostras de animais imunizados com antígenos de Tcra e comparados com o grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de ELISA utilizando antígeno LV-Tcra.

FIGURA 6. Resultado do ELISA em amostras dos grupos imunizados com: 20 μ g de LV-Tcra (GII), 50 μ g de LV-Tra (GIII e GV), com gel<30kD de LV-Tcra (GIV), com fração eluída (<30kD) de LV-Tcra (GVI) e controle (GI). Placa sensibilizada com LV-Tcra e utilizando conjugado anti-Ig-total (A): 1:5000, anti-IgM (B) e anti-IgG (C): 1:2000 e anti-IgA (D): 1:1000 e soro 1:500 (A; B; C) e 1:10 (D).

Utilizando conjugado anti-Ig-total, pode-se verificar que o soro dos animais imunizados com Tcra apresentavam anticorpos que identificavam antígeno LV-Tcra (fig. 6; A). Após a obtenção desses dados, houve possibilidade de caracterizar cada isotipo de anticorpos isoladamente (fig. 6; B; C; D).

Nos animais dos GII, GIII e GVI inoculados respectivamente com 20 μ g, 50 μ g de LV-Tcra e com fração eluída <30kD-Tcra, os anticorpos IgM anti-Tcra foram detectados a partir do 15^o dia, decrescendo em seguida. Após o "booster", foi observado novo aumento desses anticorpos nas amostras correspondente aos 37^o dia após imunização, com exceção do GVI, que mesmo após o "booster" não apresentou estímulo à resposta secundária (fig. 6; B).

O GV foi incluído a partir das observações feitas no GIII, com o propósito de verificar a produção de IgM anterior ao 15^o dia após a imunização com 50 μ g de LV-Tcra. A análise dos dados permitiu observar que os animais do GV apresentaram anticorpos IgM anti-Tcra detectados a partir do 5^o dia, com pico no 12^o dia, apresentando queda no nível de detecção em seguida (fig. 6; B). Nesse grupo não foi aplicado o "booster", por isso não foi possível confirmar a resposta secundária para IgM.

Nos animais do GIV, inoculado com gel<30kD-Tcra, não houve produção eficaz de anticorpos IgM anti-Tcra (fig. 6; B).

Anticorpos IgG anti-LV-Tcra nas amostras de soro dos GII, GIII, GIV e GVI identificaram antígeno LV-Tcra a partir do 15^o dia, aumentando a produção no 30^o dia, com nível máximo no 37^o dia no GII e GIV e no 30^o dia no GIII, mantendo-se assim elevado até 83^o dia (fig. 6; C).

O GV, inoculado igualmente com 50 μ g de LV-Tcra (mesma dose aplicada no GIII), apresentou resultados semelhantes ao do GIII (fig. 6; C). A produção de anticorpos IgG anti-Tcra desse grupo também se iniciou a partir do 12^o, aumentando até o 32^o dia (fig. 6; C). Neste grupo não foi aplicado o "booster", por isso não houve possibilidade de observar a resposta imune secundária para IgG.

Os resultados do ELISA para o isotipo IgA, utilizando antígeno de Tcra, mostrou que anticorpos IgA foram detectados nas amostras de soro dos animais dos GIII, GIV e GVI a partir do 15^o dia após imunização, com pico de produção de anticorpos após o “booster” (37^o dia para os GIII e GIV e 44^o dia para GVI) (fig. 6; D). A detecção dos anticorpos IgA anti-Tcra no GVI foi observada até o 44^o dia após imunização, em que os níveis de anticorpos foram inferiores aos de outros grupos imunizados com Tcra (fig. 6; D). A quantidade insuficiente de amostra de alguns “pool” não permitiu a análise desse isotipo em diferentes grupos e em diferentes períodos de tempo de coleta de amostra.

5.2 - REATIVIDADE CRUZADA COM ANTÍGENO T-Tso

A figura 7 representa o perfil dos títulos de Ig-total, IgM, IgG e IgA em amostras de soro dos grupos de animais imunizados com antígenos de Tcra comparado com o grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de ELISA utilizando antígeno T-Tso.

FIGURA 7. Resultado do ELISA em amostras dos grupos imunizados com: 20 μ g de LV-Tcra (GII), 50 μ g de LV-Tcra (GIII e GV), com gel<30kD de LV-Tcra (GIV), com fração eluída (<30kD) de LV-Tcra (GVI) e controle (GI). Placa sensibilizada com T-Tso e utilizando conjugado anti-Ig-total (A): 1:5000, anti-IgM (B) e anti-IgG (C): 1:2000 e anti-IgA (D): 1:1000 e soro 1:500 (A; B; C) e 1:10 (D).

A determinação da cinética de produção de todas as classes de imunoglobulinas por meio de ELISA, utilizando antígeno LV-Tcra e T-Tso, mostrou que tanto o "pool" de soros antes da imunização, bem como do GI, inoculado com salina, não apresentaram anticorpos detectáveis contra antígenos de Tcra e Tso.

Os resultados de ELISA utilizando conjugado anti-Ig-total e antígeno de Tso, mostrou que em amostras de camundongos imunizados com Tcra houve uma evidente resposta de produção de anticorpos de reatividade cruzada (fig. 7; A).

As amostras de soro dos grupos GII, GIII e GVI apresentaram anticorpos IgM com reatividade cruzada para o antígeno T-Tso, detectados a partir do 15^o dia após imunização, com posterior decréscimo. Após o "booster", novo aumento desses anticorpos (37^o dia após imunização) foi observado, exceto o soro de GVI, que mesmo após o "booster" não apresentou aumento de níveis de IgM de reatividade cruzada (fig. 7; B).

O GV produziu anticorpos IgM que reconheceram cruzadamente antígenos T-Tso, já a partir do 5^o dia (fig. 7; B).

Anticorpos IgG produzidos pelos animais dos grupos GII e GIII reconheceram antígeno T-Tso a partir do 15^o dia, aumentando a intensidade dessa reatividade cruzada até o 83^o dia (fig. 7; C). O GIII, inoculado com maior quantidade de antígeno, quando comparado com o GII mostrou maior intensidade da reatividade de anticorpos IgG tanto com antígeno de Tcra (fig. 6; C) como antígeno de Tso (fig. 7; C), em relação ao grupo GII. No GV foi detectado IgG com reatividade para Tso a partir do 12^o dia (fig. 7; C).

Nos GIV e GVI houve produção de anticorpos IgG anti-Tcra com reatividade homóloga, mas não foram observados anticorpos IgG de reatividade cruzada com antígenos de Tso no ELISA (fig. 7; C).

Para a detecção de IgA foi necessário utilizar diluições menores das amostras, cerca de 50 vezes mais concentrada, que para IgM e IgG.

Os animais dos GIII e GIV apresentaram anticorpos IgA de reatividade cruzada para antígeno de Tso a partir do 30^o dia e o GVI após o "booster" (fig. 7; D).

5.3 - REATIVIDADE ESPECÍFICA COM Tso E CRUZADA COM Tcra

A figura 8 mostra o perfil dos títulos de Ig-total, IgM, IgG e IgA dos camundongos imunizados com antígenos de Tso comparado com o grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de teste ELISA utilizando antígeno T-Tso (A) e LV-Tcra (B).

A

B

FIGURA 8. Resultado do ELISA em amostras dos grupos imunizados com 50µg de T-Tso (GVII) e controle (GI). Placa sensibilizada com T-Tso (A) e LV-Tcra (B) utilizando conjugados: anti-Ig 1:5000, anti-IgM e IgG 1:2000 e anti-IgA 1:1000 e soro 1:500 e 1:10(IgA).

Os resultados de ELISA utilizando antígeno T-Tso e conjugado anti-Ig-total mostrou que houve detecção de anticorpo anti-Tso, a partir do 5^o dia após imunização, no soro dos animais imunizados com Tso (fig. 8; A).

Observou-se que os anticorpos IgM anti-Tso foram detectados a partir do 5^o dia, IgG a partir do 15^o dia, aumentando o título com o decorrer do tempo, apresentando um nível máximo destes anticorpos após o “booster” (fig. 8; A).

A produção dos anticorpos IgA anti-Tso no GVII foi analisada antes da imunização (tempo zero) e no 39^o e 50^o dia após a imunização, por não haver disponibilidade de amostras de outras coletas. Quando analisadas por ELISA-Tso, um aumento na produção de anticorpo do isotipo IgA foi observado após o “booster” (fig. 8; A).

Os anticorpos produzidos pelos animais do GVII, imunizados com Tso, reconheceram cruzadamente os antígenos de Tcra por meio de ELISA (fig. 8; B), mostrando cinética semelhante à da resposta homóloga, exceto para anticorpos IgM que foi detectado um novo aumento na produção após o “booster”, sendo que este aumento não foi observado no ELISA-Tso.

6 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM SEPHAROSE 4B-PROTEÍNA

A

A figura 9 representa os valores de densidade óptica do primeiro (A) e segundo (B) pico do "pool" de soros após a cromatografia de proteína "A" da amostra do grupo IV, ("PIV₆₀"); animais imunizados com gel<30kD-Tcra e amostra coletada 60 dias após imunização.

A

B

Figura 9. Valores de densidade óptica obtidos em eluatos de cromatografia de proteína "A" obtidos em volume de 1mL (V) após eluição com o tampão fosfato de sódio e NaCl pH 7,0 (A: V1, V2, V3, V4, V5, V6 e V7) e das frações IgG eluídas em tampão citrato de sódio pH 3,0 (B: V8, V9, V10, V11, V12 e V13) do "pool" de soros de camundongos imunizados com gel <30kD 60 dias após imunização (PIV₆₀).

O resultado da cromatografia Sepharose 4B-proteína A mostrou que houve a formação de dois picos: um primeiro pico constituído de imunoglobulinas sem afinidade pela proteína "A" (IgM e IgA) (fig. 9; A) e um segundo contendo imunoglobulinas com afinidade por proteína "A", ou seja, IgG (fig. 9; B).

6.1 - RESULTADOS DO ELISA IgA DAS FRAÇÕES ELUÍDAS

A tabela 3 apresenta o resultado de ELISA realizado com PIV₆₀ utilizando antígeno LV-Tcra e conjugado anti-IgA, antes e após o fracionamento do soro em coluna de proteína-A

TABELA 3. Valores de D.O. obtidos no ELISA com soro antes da imunização (PIV₀) e de camundongos imunizados com gel <30kD 60 dias após imunização (PIV₆₀), antes e após purificação em coluna de cromatografia proteína-A. ELISA utilizando antígenos LV-Tcra e conjugado anti-IgA a 1:1000.

	D.O. das amostras antes e após (1 ^o e 2 ^o "pool") eluição								
Diluição do soro	1:10	1:20	1:40	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
PIV ₀	0,211	0,145	0,113	0,100	0,094	0,088	0,093	0,077	
PIV ₆₀	2,420	2,357	2,313	2,195	1,969	1,750	1,427	1,135	
PIV ₆₀ (1 ^a fração)		2,602	2,420	2,167	1,803	1,340	0,852	0,553	0,352
PIV ₆₀ (2 ^a fração)		0,473	0,314	0,233	0,172	0,130	0,107	0,097	0,093

A análise de dados obtidos nas amostras dos dois picos por meio de ELISA para anticorpos IgA mostrou ausência de aumento de título de anticorpos IgA, indicando que não houve competição entre anticorpos IgA e IgG pelos mesmos sítios antigênicos.

7 - PEPTÍDEOS DOS ANTÍGENOS LV-Tcra E T-Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS ANTI-LV-TCRA E ANTI-T-TSO

A partir da reatividade observada no ELISA entre os soros imunes dos camundongos e os antígenos homólogo e heterólogo, foi padronizada a técnica de blot para acompanhar o reconhecimento dos peptídeos dos antígenos LV-Tcra e T-Tso pelos anticorpos nos soros dos camundongos imunizados com esses antígenos.

7.1 - REATIVIDADE HOMÓLOGA COM ANTÍGENOS LV-Tcra

7.1.1 - PEPTÍDEOS DE Tcra RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS Ig-TOTAL ANTI-Tcra

A figura 10 apresenta o resultado de identificação de peptídeos de Tcra pelos anticorpos Ig-total em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 10. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1) controle da nitrocelulose; (2-6) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20µg de LV-Tcra); (7-11) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50µg de LV-Tcra); (12-16) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (17-22) PVI₀, 5, 15, 30, 39 e 44 (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (23-27) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30, 39 e 44 dias após imunização. Conjugado anti-Ig-total a 1:2000, amostras a 1:500 e antígeno LV-Tcra aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.
➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Pode-se observar que as imunoglobulinas presentes nos soros dos animais imunizados com Tcra identificaram, com menor intensidade, o peptídeo 12-14kD de LV-Tcra no 15^o dia, aumentando a intensidade até o último dia de coleta das amostras. O peptídeo 18kD de LV-Tcra foi identificado a partir do 30^o dia após a imunização.

7.1.2 - PEPTÍDEOS DE Tcra RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgM ANTI-Tcra

A figura 11 apresenta os resultados de identificação de peptídeos de Tcra pelos anticorpos IgM em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 11. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1) controle da nitrocelulose, (2-6) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20µg de LV-Tcra); (7-11) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50µg de LV-Tcra); (12-16) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (17-22) PVI₀, 5, 15, 30, 39 e 44 (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (23-27) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30, 39 e 44 dias após imunização. Conjugado anti-IgM diluído a 1:1000, amostras diluídas a 1:100 e antígeno LV-Tcra aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os anticorpos IgM anti-Tcra presentes nas amostras dos animais do GII e GIII identificaram os peptídeos 18 e 14-12kD, a partir do 15^o dia após a imunização, observando-se uma diminuição na reatividade no 30^o dia. Após o "booster" (37^o dia) e no último dia (83^o dia) um aumento de intensidade de reatividade foi verificado (fig.11; 2-11), até mesmo no grupo inoculado com gel<30kD-Tcra (fig. 11; 12-16). Por conseguinte, neste grupo os anticorpos IgM que não foram identificados por ELISA seja para Tcra-homóloga (fig. 6; B), seja para Tso-heteróloga (fig. 7; B), foi observado reatividade desses anticorpos por blot.

No GVI os anticorpos IgM identificaram os peptídeos 14-12kD no 15^o dia e 12-18kD no 39^o e 44^o dia após imunização (fig. 11; 17-22).

O peptídeo 94kD de Tcra foi reconhecido por anticorpos IgM, até mesmo pelo grupo controle (fig. 11; 23-27).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

7.1.3 - PEPTÍDEOS DE Tcra RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgG ANTI-Tcra

A figura 12 representa os resultados obtidos na identificação de peptídeos de Tcra pelos anticorpos IgG em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 12. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1) controle da nitrocelulose; (2-6) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20µg de LV-Tcra); (7-11) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50µg de LV-Tcra); (12-16) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (17-22) PVI₀, 5, 15, 30, 39 e 44 (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (23-27) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30, 39 e 44 dias após imunização. Conjugado anti-IgG diluído a 1:2000, amostras diluídas a 1:500 e antígeno LV-Tcra aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Em todos os grupos imunizados com Tcra houve identificação de fraca reatividade dos peptídeos 18 e 14-12kD no 15^o dia após imunização, aumentando a intensidade de reconhecimento desses peptídeos a partir do 30^o dia até a última coleta (83^o dia) (fig. 12; 2-22). Essa reatividade foi concordante com o resultado obtido no ELISA utilizando antígeno homólogo, onde a partir do 15^o dia após imunização já era possível observar a presença do isotipo IgG (fig. 6; C).

7.1.4 - PEPTÍDEOS DE Tcra RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgA ANTI-Tcra

A figura 13 mostra o perfil dos peptídeos de Tcra identificados pelos anticorpos IgA em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 13. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1-5) Pill_{0, 15, 30, 37 e 60} (50µg de LV-Tcra); (6-10) PIV_{0, 15, 30, 37 e 60} (gel <30kD-Tcra); (11-14) PVI_{0, 15, 30 e 39} (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (15-17) PI_{0, 30 e 37} (controle). Os "pool" utilizados foram: antes a inoculação (0) e 30 e 37 do GI; 0, 15, 30, 37 e 60 dos GIII e GIV; 0, 15, 30 e 39 do GVI. Conjugado anti-IgA a 1:1000, amostras a 1:10 e antígeno LV-Tcra aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.
➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os anticorpos IgA presentes em soros dos animais dos GIII e GIV reconheceram os peptídeos de 18 e 14-12kD do antígeno LV-Tcra a partir de 30^o dia, com aumento de intensidade de reconhecimento com o decorrer do tempo (fig. 13; 1-10). No GVI os anticorpos IgA identificaram esses peptídeos no 39^o dia após imunização (fig. 13; 11-14).

7.2 - REATIVIDADE CRUZADA COM ANTÍGENO T-Tso

7.2.1 - PEPTÍDEOS DE Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS Ig-TOTAL ANTI-Tcra

A figura 14 apresenta o perfil dos peptídeos de Tso identificados pelos anticorpos Ig-total em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 14. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1-5) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20µg de LV-Tcra); (6-10) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50µg de LV-Tcra); (11-15) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (16-20) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle) e (21-25) PVI₀, 5, 15, 30 e 39 (fração eluída (<30kD)-Tcra). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30 e 39 dias após imunização. Conjugado anti-Ig-total diluído a 1:500, amostras diluídas a 1:10 e antígeno T-Tso aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Por meio da análise do blot foi verificado que as imunoglobulinas presentes nos soros dos animais imunizados com Tcra identificaram cruzadamente o peptídeo 12kD já no 15^o dia; 37 e 35kD de Tso no 30^o, 37^o e 83^o dias após imunização (fig. 14; 1-15 e 21-25).

7.2.2 - PEPTÍDEOS DE Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgM ANTI-Tcra

Na figura 15 está apresentado o perfil dos peptídeos de Tso identificados pelos anticorpos IgM em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 15. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1) controle da nitrocelulose; (2-6) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20μg de LV-Tcra); (7-11) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50μg de LV-Tcra); (12-16) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (17-21) PVI₀, 5, 15, 30 e 39 (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (22-26) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30 e 39 dias após imunização. Conjugado anti-IgM diluído a 1:500, amostras diluídas a 10 e antígeno T-Tso aplicado na quantidade de 6μg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Anticorpos IgM anti-Tcra no soro dos GII e GIII reconheceram o peptídeo 30kD de Tso no 15^o, 30^o, 37^o e 83^o dia. Esta reação apresentou-se com maior intensidade no 15^o e 37^o dias após imunização (fig. 15; 2-11), confirmando os dados obtidos no resultado do ELISA heterólogo (fig. 7; B), que apresentaram dois picos de reatividade cruzada (no 15^o e 37^o dia).

Nos soros dos animais do GIV houve a detecção de anticorpos IgM que reconheceram fracamente os peptídeos 60, 43, 30 e 12 kD de T-Tso no 83^o dia (fig. 15; 12-16), embora não tenham sido detectados anticorpos IgM no ELISA-Tso (fig. 7; B). Animais do GVI produziram anticorpos IgM que identificaram fracamente o peptídeo 30kD de T-Tso no 15^o, 30^o e 39^o dia após imunização (fig. 15; 17-21). A reatividade foi mais fraca no 30^o dia.

Os anticorpos IgM reconheceram os peptídeos 115, 94, e 70 kD de Tso em todas os grupos, inclusive no controle, caracterizando a inespecificidade desses peptídeos (fig. 15; 22-26).

7.2.3 - PEPTÍDEOS DE Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgG ANTI-Tcra

A figura 16 mostra o perfil dos peptídeos de Tso identificados pelos anticorpos IgG em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 16. Blot dos "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1-5) PII₀, 15, 30, 37 e 83 (20µg de LV-Tcra); (6-10) PIII₀, 15, 30, 37 e 83 (50µg de LV-Tcra); (11-15) PIV₀, 15, 30, 37 e 83 (gel <30kD-Tcra); (16-20) PVI₀, 5, 15, 30 e 39 (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (21-25) PI₀, 15, 30, 37 e 83 (controle). Tempos de coleta: os grupos GI, GII, GIII e GIV foram sangrados antes da inoculação (0) e 15, 30, 37 e 83 dias após imunização e o GVI foi sangrado antes da inoculação (0) e 5, 15, 30 e 39 dias após imunização. Conjugado anti-IgG diluído a 1:500, amostras diluídas a 1:10 e antígeno T-Tso aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os anticorpos IgG produzidos pelos animais dos GII e GIII reconheceram o peptídeo 12kD de Tso a partir do 15^o dia, e os de 40 (apenas no GII), 37, 35 e 25kD de Tso a partir do 30^o dia, aumentando a intensidade com o decorrer do tempo (fig. 16; 1-10).

Os soros dos animais dos GIV e GVI apresentaram anticorpos IgG anti-Tcra que reconheceram o peptídeo 12kD de Tso no 15^o dia (no GIV) e 30^o dia (no GVI). Houve gradual aumento de intensidade de reação contra esse peptídeo e no 83^o dia foram reconhecidos também os peptídeos 45 e 35kD pelos anticorpos no soro do GIV (fig. 16; 11-20). Foi observada reatividade inespecífica com 70kD de Tso nas amostras antes da inoculação no GIV (figura 16, 11-15) e também, com os peptídeos 115, 95, e 70 kD em todas os grupos, inclusive no controle (fig. 16; 21-25).

7.2.4 - PEPTÍDEOS DE Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IgA ANTI-Tcra

Na figura 17 está apresentado o perfil dos peptídeos de Tso identificados pelos anticorpos IgA em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle (inoculado com salina), obtidos por meio de blot.

FIGURA 17. Blot com os "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tcra e grupo controle. (1-5) PIII_{0, 15, 30, 37 e 60} (50µg de LV-Tcra); (6-10) PIV_{0, 15, 30, 37 e 60} (gel <30kD-Tcra); (11-14) PVI_{0, 15, 30 e 39} (fração eluída (<30kD)-Tcra) e (15-17) PI_{0, 30 e 37} (controle). Os "pool" utilizados foram: antes da inoculação (0), 30 e 37 do GI; 0, 15, 30, 37 e 60 dos GIII e GIV e 0, 15, 30 e 39 do grupo GVI. Conjugado anti-IgA diluído a 1:500, amostras diluídas a 1:10 e antígeno T-Tso aplicado na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.
➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Observou-se que anticorpos IgA presente nos soros de GIII, GIV e GVI identificaram os peptídeos 65, 50, 30 e 12kD de Tso no 60^o dia (nos GIII e GIV) e no 39^o dia (no GVI) (fig. 17; 1-14).

7.3 - PEPTÍDEOS DE Tso RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS ANTI-Tso

Na figura 18 está apresentado o perfil dos peptídeos de Tso identificados pelos anticorpos Ig-total A (1-5), IgM B (6-10), IgG C(11-15) e IgA D (16-18) em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tso, obtidos por meio de blot.

FIGURA 18. Blot com os "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tso. A (1-5) PVII_{0, 5, 15, 30 e 39} e anticorpo Ig-total; B (6-10) PVII_{0, 5, 15, 30 e 39} e anticorpos IgM; C (11-15) PVII_{0, 5, 15, 30 e 39} e anticorpos IgG e D (16-18) PVII_{0, 30 e 39} e anticorpos IgA. Os "pool" utilizados foram: antes da inoculação (0), 5, 15, 30 e 39 dias após imunização. Conjugados anti-Igtotal, IgM, IgG e IgA diluídos a 1:500, amostras diluídas a 1:10 e antígeno T-Tso aplicados na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

As imunoglobulinas presentes nos soros dos animais imunizados com 50µg de T-Tso apresentaram forte reatividade específica com os peptídeos 60, 40-35, 28, 25, 22, 18 e 12kD de Tso entre o 15^o e 39^o dia após imunização (fig. 18; 1-5).

Anticorpos IgM anti-Tso presentes nos soros desses animais reconheceram especificamente os peptídeos 60, 43, 39, 30, 28, 25 e 12 kD de Tso já a partir do 5^o dia após imunização, e a intensidade da reatividade foi aumentando com o decorrer do tempo (fig. 18; 6-10). Os anticorpos IgG apresentaram reatividade com os peptídeos 75, 67, 60, 40-35, 18 e 12kD de Tso no 15^o dia, ocorrendo um ligeiro aumento na intensidade de reatividade nos 30^o e 39^o dia, com reconhecimento dos peptídeos 47, 45 e 25kD (fig. 18;11-15). Foi observado que anticorpos IgA anti-Tso reconheceram especificamente os peptídeos 45 , 40-35, 28-25 e 18 kD de Tso no 39^o dia (Fig. 18; 16-18).

7.4 - PEPTÍDEOS DE Tcra RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS ANTI-Tso

A figura 19 representa os resultados obtidos na identificação de peptídeos de Tcra pelos anticorpos IgM A (1-4), IgG B (5-8) e IgA C (9-11) em soros de camundongos imunizados com antígenos de Tso, obtidos por meio de blot.

FIGURA 19. Blot com os "pool" (P) de soros dos camundongos imunizados com antígenos de Tso. A (1-4) PVII_{0, 15, 30 e 39} e anticorpo IgM; B (5-8) PVII_{0, 15, 30 e 39} e anticorpos IgG e C (9-11) PVII_{0, 30 e 39} e anticorpos IgA. Animais imunizados com 50µg de T-Tso. Os "pool" utilizados foram: antes da inoculação (0), 5, 15, 30 e 39 dias após imunização. Conjugados IgM, IgG e IgA diluídos a 1:500, amostras diluídas a 1:10 e antígeno LV-Tcra aplicados na quantidade de 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os anticorpos IgM anti-Tso reconheceram os peptídeos 72, 35, 30, 24, e 14kD (Fig. 19; 1-4); os anticorpos IgG reagiram com os peptídeos 95, 70, 50, 30, 18 e 14 kD (Fig. 19; 5-8) e os anticorpos IgA, por sua vez, reconheceram os peptídeos 70, 37, 35, 30, 18 e 14kD de Tcra (Fig. 19; 9-11).

8 - OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PELA TECNOLOGIA DE HIBRIDOMAS

8.1 - RESULTADOS DO ELISA APÓS FUSÃO CELULAR

Após a fusão celular entre células esplênicas de camundongos BALB/c fêmeas imunizados com 50µg de LV-Tcra e células de mieloma P₃X₆₃-Ag8.653, no 40^o dia após a imunização, as células híbridas obtidas foram distribuídas em 4 placas. A seleção por ELISA iniciou no 9^o dia após a fusão com a placa 3 utilizando antígeno LV-Tcra e T-Tso e conjugado anti-Ig-total-camundongo. A partir desses resultados foram feitos novos testes para determinação dos isotipos de imunoglobulinas secretadas pelas células híbridas.

Na tabela 4 estão apresentados os 73 clones secretores de imunoglobulinas e 64 clones secretores de IgG da placa 3, que identificaram antígenos LV-Tcra através do ELISA no 9^o e 11^o dia após a fusão celular.

TABELA 4. Clones secretores de imunoglobulinas e clones secretores de anticorpos IgG que identificaram antígenos LV-Tcra por meio de ELISA utilizando sobrenadante de cultura de hibridomas da placa 3 no 9^o (Ig-total) e 11^o (IgG) dia após a fusão celular.

Nº correspondente do Clone	Clones Ig-total com reatividade para LV-Tcra											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	73	74	75									
	Clones IgG com reatividade para LV-Tcra											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	25	26	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37
	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
	50	51	52	53	55	56	57	58	59	60	61	62
	63	64	67	69	71	74	75					

74: C₁ + controle positivo: PII₈₃

75: C - controle negativo: meio de cultura

Clones 7 e 33: selecionados para blot-Tcra

A figura 20 mostra os resultados de ELISA realizado na avaliação dos 73 clones secretores de imunoglobulinas e 64 clones secretores de anticorpos IgG da placa 3 que identificaram antígenos LV-Tcra e controle, relacionados anteriormente na tabela 4.

FIGURA 20. Resultados de ELISA utilizando sobrenadante de 73 clones secretores de imunoglobulinas e 64 clones secretores de IgG da placa 3, diluídos a 1:3 nove ou onze dias após fusão entre células de mielomas e células de camundongos imunizados com 50µg de LV-Tcra, controle positivo PII₈₃ (74) diluído a 1:500 e controle negativo (meio de cultura, 75). Placa sensibilizada com LV-Tcra; conjugados anti-Ig-total-camundongo diluído a 1:2500 e anti-IgG-camundongo diluído a 1:1000.

O ELISA realizado com a placa 3, nove dias após a fusão, utilizando conjugado anti-Ig-total indicou que houve produção de 73 clones secretores de anticorpos que identificaram antígeno de Tcra; desses, 64 clones secretaram anticorpos IgG que reconheciam antígeno LV-Tcra.

Na tabela 5 estão apresentados os 48 clones secretores de imunoglobulinas e 5 clones secretores de anticorpos IgG da placa 3 que identificaram antígenos T-Tso por meio de ELISA no 9^o e 11^o dias após a fusão celular.

TABELA 5. clones secretores de imunoglobulinas e clones secretores de IgG que identificaram antígenos T-Tso através do ELISA utilizando sobrenadante de cultura de hibridomas da placa 3 no 9^o (Ig-total) e 11^o (IgG) dia após a fusão celular.

Nº correspondente do Clone	Clones Ig-total com reatividade para T-Tso											
	2	3	4	6	7	8	10	14	15	16	21	22
	23	24	25	26	27	28	29	30	33	34	35	36
	37	38	39	40	41	42	44	45	46	47	48	49
	50	51	52	53	56	57	58	59	60	61	62	63
	74	75										
	Clones IgG com reatividade para T-Tso											
	21	24	44	45	56	74	75					

74: C₁ + controle positivo: PII₈₃

75: C - controle negativo: meio de cultura

Clones **7** e **33**: selecionados para blot-Tcra

A figura 21 mostra os resultados do ELISA de 48 clones secretores de imunoglobulinas e 5 clones secretores de IgG da placa 3 que identificaram antígenos T-Tso e controle, relacionados anteriormente na tabela 5.

FIGURA 21. Resultados de ELISA utilizando sobrenadante de 48 clones secretores de imunoglobulinas e 5 clones secretores de IgG da placa 3, diluídos a 1:3 após fusão celular entre células de mielomas e células de camundongos imunizados com 50ug de LV-Tcra, controle positivo PII₈₃ (74) diluído a 1:500 e controle negativo (meio de cultura/nº 75). Placa sensibilizada com T-Tso e conjugados anti-Ig-total-camundongo diluído a 1:2500 e anti-IgG-camundongo diluído a 1:1000.

A análise mostrou que dos 73 clones da placa 3 que reconheceram antígeno de Tcra utilizando conjugado anti-Ig-total-camundongo, 48 identificaram antígeno de Tso, quando foi utilizado o mesmo conjugado.

Dos 64 clones secretores de anticorpos IgG que reconheceram antígeno LV-Tcra, 5 identificaram cruzadamente o antígeno de Tso, sendo 21, 24, 44, 45 e 56, os clones com esta reatividade.

Baseado na análise dos dados da placa 3 foi decidido determinar os isotipos de imunoglobulinas secretados pelas células híbridas da placa 4 por ELISA.

A tabela 6 mostra 36 clones secretores de anticorpos IgM e 53 secretores de IgG da placa 4 que identificaram antígenos LV-Tcra por meio do ELISA no 11^o dia após a fusão celular.

TABELA 6. Clones secretores de anticorpos IgM e clones secretores de anticorpos IgG que identificaram antígenos LV-Tcra por meio de ELISA utilizando sobrenadante de cultura de hibridomas da placa 4 no 11^o dia após a fusão celular.

Nº correspondente do Clone	Clones IgM com reatividade para LV-Tcra												
	4	6	7	8	9	10	14	15	17	18	21	22	23
	24	25	26	27	28	30	31	32	33	34	35	36	37
	38	42	43	44	46	47	48	52	53	56	76	75	
	Clones IgG com reatividade para LV-Tcra												
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	16	17	20	21	23	24	25	26	27	28	29	30	31
	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
	59	74	75										

74: C₁ + controle positivo: PII₈₃

75: C - controle negativo: meio de cultura

76: C₂+ controle positivo: PII₃₇

A figura 22 mostra os resultados do ELISA de 36 clones secretores de anticorpos IgM e 53 clones secretores de IgG da placa 4 que identificaram antígenos LV-Tcra e controles, relacionados anteriormente na tabela 6.

FIGURA 22 . Resultados de ELISA utilizando sobrenadante de 36 clones secretores de IgM e 53 secretores de IgG da placa 4, diluídos a 1:3 após fusão celular entre células de mielomas e células de camundongos imunizados com 50ug de LV-Tcra, controle positivo PII₈₃ (74) e PII₃₇ (76) diluídos a 1:500 e controle negativo (meio de cultura/nº 75). Placa sensibilizada com LV-Tcra; conjugados anti-IgM-camundongo e anti-IgG-camundongo diluídos a 1:1000.

Os resultados de ELISA da placa 4 mostrou a ocorrência de 36 clones com produção de anticorpos IgM que identificaram antígeno LV-Tcra.

A placa 4 apresentou, ainda, 53 clones secretores de anticorpos IgG que identificaram antígeno de Tcra. Analisando os sobrenadantes retirados das cavidades, pode-se observar que 32 cavidades desta placa possui clones que secretam anticorpos IgM e clones que secretam anticorpos IgG que identificaram o antígeno de Tcra.

A tabela 7 mostra 40 clones secretores de anticorpos IgM e 5 secretores de IgG da placa 4 que identificaram antígenos T-Tso através do ELISA no 11^o dia após a fusão celular.

TABELA 7. Clones secretores de anticorpos de anticorpos IgM e clones secretores de IgG que identificaram antígenos T-Tso através do ELISA utilizando sobrenadante de cultura de hibridomas da placa 4 no 11^o dia após a fusão celular.

Nº correspondente do Clone	Clones IgM com reatividade para T-Tso												
	3	4	5	7	8	9	10	14	17	18	20	21	22
	23	24	25	26	27	28	29	31	32	33	34	35	36
	37	38	40	41	42	44	46	47	48	51	52	53	54
	56	76	75										
	Clones IgG com reatividade para T-Tso												
	1	19	60	61	62	74	75						

74: C₁ + controle positivo: PII₈₃

75: C - controle negativo: meio de cultura

76: C₂+ controle positivo: PII₃₇

A figura 23 mostra os resultados do ELISA dos 40 clones da placa 4 secretores de anticorpos IgM e 5 secretores de anticorpos IgG, que identificaram antígenos T-Tso e controles, por meio do ELISA no 11^o dia após a fusão celular.

FIGURA 23. Resultados de ELISA utilizando sobrenadante de 40 clones secretores de IgM e 5 secretores de IgG da placa 4, diluídos a 1:3 após fusão celular entre células de mielomas e células de camundongos imunizados com 50ug de LV-Tcra; controle positivo PII₈₃ (74) e PII₃₇ (76) diluídos a 1:500 e controle negativo (meio de cultura/n^o 75). Placa sensibilizada com antígeno T-Tso; conjugado anti-IgM-camundongo e anti-IgG-camundongo diluídos a 1:1000.

Na placa 4 foi observado que 40 clones apresentaram resposta IgM anti-Tso, sendo que destes, 33 com reatividade IgM anti-Tcra e dos 33, apenas 7 reconheceram antígeno de Tso.

Foi observado que apenas 5 clones secretores de IgG apresentaram reatividade com antígeno de Tso, e esses não identificaram antígeno de Tcra. Nenhuma das cavidades desta placa possui clones secretores de IgM e clones secretores de IgG identificados por antígeno de Tso.

A figura 24 quantifica o número de clones secretores de anticorpos IgM (**amarelo**) e secretores de IgG (**azul**) capaz de reconhecer antígenos LV-Tcra e/ou T-Tso, oriundos da placa 4.

FIGURA 24. Quantidade de clones positivo por placas (96 orifícios) que secretam anticorpos IgM ou IgG por ELISA, 11 dias após fusão celular entre células de mielomas e células de camundongos imunizados com antígeno LV-Tcra. Placas sensibilizadas com LV-Tcra ou T-Tso, conjugado anti-IgM-camundongo e IgG-camundongo diluídos a 1:1000.

Algumas cavidades da placa 4 apresentaram clones secretores de anticorpos IgM e clones secretores de anticorpos IgG. Por meio de diluição limitante pode-se separar individualmente a célula híbrida secretora de um isotipo de anticorpo com especificidade definida.

A partir dos resultados obtidos durante a triagem utilizando conjugado anti-Ig-total, anti-IgM e anti-IgG-camundongo foram selecionados 72 clones para fazer a expansão celular em placas de 24 cavidades. Nove dias após a transferência foi feito o ELISA com 16 clones selecionados em vista do crescimento celular. O teste foi feito utilizando conjugado anti-Ig-total-camundongo com ambos os antígenos.

A tabela 8 representa os 16 clones produtores de imunoglobulinas capaz de reconhecer antígenos de Tcra e Tso através do ELISA no nono dia após transferência para placa de 24 cavidades.

TABELA 8. Clones secretores de imunoglobulinas da placa 3 (**nº em azul**) e da placa 4 (**nº em vermelho**) que identificaram antígenos LV-Tcra e T-Tso através do teste ELISA nove dias após a transferência para placa de 24 cavidades.

Clones com reatividade para T-Tso									
Nº	7	15	24	34	35	38	48	8	20
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Nº	21	24	27	28	32	34	35	74	75
	10	11	12	13	14	15	16		

74: C₁ + controle positivo: PII₈₃

75: C - controle negativo: meio de cultura

Nº: Número correspondente do clone

Na figura 25 estão os resultados dos 16 clones secretores de imunoglobulinas 9 dias após serem transferidos para placa de 24 cavidades, que identificaram antígenos de Tcra e Tso por meio de ELISA e controles, relacionados anteriormente na tabela 13.

FIGURA 25. Resultados de ELISA utilizando sobrenadante de 16 clones de células híbridas 9 dias após transferência para placa de 24 cavidades, utilizado sem diluir; controle positivo PII₈₃ (74), diluído a 1:500 e controle negativo (meio de cultura/nº 75). Placa sensibilizada com antígenos LV-Tcra ou T-Tso; conjugado anti-Igtotal-camundongo diluído a 1:1000.

Os resultados mostraram que os clones reconheciam antígeno LV-Tcra e, também, apresentaram reatividade cruzada com o antígeno T-Tso. Os clones **7** e **35** (placa 3), **8** e **21** (placa 4) apresentaram maior intensidade de reatividade com antígeno Tso quando comparando com Tcra.

Após a triagem e, conseqüentemente, após a transferência para placa de cultura de 24 cavidades foram selecionados dois clones da placa 3 a fim se de avaliar a reatividade por blot. O clone **7** foi selecionado por ter apresentado reatividade com os antígenos LV-Tcra e T-Tso utilizando o conjugado anti-Ig-total (fig. 20 e 21) e por secretar anticorpos IgG anti-Tcra (fig. 20) e, além disso apresentou maior reatividade por ELISA utilizando T-Tso que LV-Tcra, após ser transferido para placa de 24 cavidades (fig. 25). Já o **33** foi selecionado por ter identificado antígenos LV-Tcra e T-Tso utilizando o conjugado anti-Ig-total-camundongo (fig. 20 e 21) e por ter apresentado elevado crescimento celular após a transferência (não foi feito ELISA deste após a transferência).

8.2 – REATIVIDADE DOS ANTICORPOS SECRETADOS PELAS CÉLULAS HÍBRIDAS AOS PEPTÍDEOS DE Tcra POR BLOT

A figura 26 mostra o resultado do blot dos anticorpos secretados pelos clones 7 e 33 após a transferência das células para placas de 24 cavidades. O antígeno utilizado foi LV-Tcra e conjugado anti-Ig-total-camundongo-fosfatase.

FIGURA 26. Resultado do blot utilizando sobrenadante de cultura dos clones: (1) 7 e (2) 33, (3) controle positivo, PII_{BS} dos animais imunizados com 50µg de LV-Tcra diluído 1:500 e (4) meio de cultura (controle negativo). Conjugado anti-Ig-total-camundongo-fosfatase diluído a 1:1000 e antígeno LV-Tcra aplicado na proporção 6µg/mm no SDS-PAGE 7-20%.

➡ (peptídeos abaixo de 20kD)

Os anticorpos dos clones 7 e 33 reconheceram os peptídeos 18 e 14-12kD de Tcra.

Os dados obtidos em nossos experimentos são promissores e aumentam a expectativa de obter a produção de anticorpos anti-Tcra de reatividade

cruzada com Tso, que poderão ser estabilizados e utilizados futuramente na pesquisa de antígenos na cisticercose humana e suína. Ademais, esses reagentes imunobiológicos poderão ser empregados como ferramenta, auxiliando o diagnóstico e a elucidação dos mecanismos imunopatogênicos da relação parasita-hospedeiro na NC humana. Por outro lado, os MAbs específicos obtidos serão relevantes na purificação imunoquímica do antígeno de reatividade cruzada observada no modelo experimental de infecção por Tcra.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

DISCUSSÃO

A dificuldade em obter antígenos de líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* devido ao rompimento das larvas durante o processo de extração, não nos propicia a disponibilidade deste antígeno, que é rico em peptídeos de baixo peso molecular, considerados imunodominantes no estudo da cisticercose (GOTTSTEIN et al., 1987; TSANG et al., 1989).

A observação de reatividade cruzada entre os cestodas (*T. solium* e *T. crassiceps*) possibilita a utilização de fonte alternativa de obtenção desses antígenos de líquido vesicular. As larvas de *T. crassiceps* são mantidas pela inoculação intraperitoneal de vesículas pequenas em camundongos fêmeas BALB/c. A disponibilidade deste modelo alternativo experimental em laboratório, como fonte de parasita, para a obtenção de antígenos de Tcra, torna possível sua utilização no diagnóstico da cisticercose suína (PARKHOUSE & HARRISON, 1987), e humana (KUNZ et al., 1989; LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997a).

Neste trabalho, estudamos a reatividade cruzada de anticorpos imune para peptídeos de baixo peso molecular do líquido vesicular de Tcra, bem como a obtenção de MAb anti-LV-Tcra com reatividade para peptídeos de Tso.

Da Caracterização dos Antígenos de Tcra e Tso por SDS-PAGE

As preparações antigênicas (LV-Tcra e T-Tso) foram avaliadas quanto à concentração e rendimento protéicos (tabela 2). Se comparamos o antígeno total obtido de Tso com o de líquido vesicular de Tcra, observamos que o antígeno LV-Tcra além da facilidade de preparação, apresentou maior rendimento. A partir dos parasitas (Tcra) obtidos de um camundongo inoculado, obtivemos 30,8mg de proteína, enquanto que dos cisticercos (Tso) retirados de duas peças de suíno, foram obtidos 180,9mg de proteína. A partir de 10 camundongos inoculados com Tcra foram obtidos um grande volume e quantidade de proteína do antígeno LV-Tcra. A obtenção de antígenos de líquido vesicular de Tso foi inviável para este trabalho.

O antígeno LV-Tcra mostrou um padrão mais homogêneo na caracterização por SDS-PAGE, com elevada concentração de peptídeos localizados na região <20kD, que são considerados imunodominantes (KUNZ et al., 1989), enquanto que o antígeno T-Tso mostrou um padrão mais complexo de peptídeos (fig. 1). Esta complexidade ocorre pela presença de proteínas de membrana e escólex no antígeno T-Tso e vem sendo relatada por diversos autores (GROGL et al., 1985, GOTTSTEIN et al., 1986, VAZ, 1993).

A pequena quantidade de peptídeos de baixo peso molecular observada no antígeno T-Tso é consequência do rompimento das larvas de Tso no momento em que são retiradas dos músculos do suíno, propiciando a perda do líquido vesicular. Procedimentos de purificação podem ser utilizados para obtenção de antígenos de baixo peso molecular de Tso (TSANG et al., 1989), mas são, em geral, de reduzido rendimento.

Da Caracterização dos Antígenos por Blot

Neste estudo analisamos a composição dos antígenos quanto ao conteúdo de resíduos de açúcares por meio de blot-lectina (fig. 5).

Verificamos que os resíduos de açúcares presentes nos peptídeos do antígeno LV-Tcra são galactose, glicose e/ou manose. Isso porque houve interação no blot entre o antígeno e a lectina BS-I, que é específica para galactose (fig. 5-A; 3), e do antígeno com ConA que é específica para glicose/manose (fig. 5-A; 6). Uma baixa reatividade foi observada com peptídeos de 20 e 18kD de Tcra e lectinas BS-I (fig. 5-A; 3) e ConA (fig. 5-A; 6). A especificidade dessa reatividade foi confirmada com reação de competição entre galactose e BS-I (fig. 5-A; 4) e entre glicose e ConA (fig. 5-A; 7). Os peptídeos >94kD de LV-Tcra permaneceram reativos após a competição entre glicose e ConA (fig. 5-A; 7), não descartando a possibilidade do antígeno ser constituído também por resíduos de manose, uma vez que este açúcar também têm afinidade por ConA (teste não realizado). A oxidação das membranas com ácido periódico e a não reatividade posterior com as lectinas BS-I (fig. 5-B; 5) e ConA (fig. 5-B; 8) confirma que os resíduos identificados eram açúcares. KUNZ et al., 1991, BAUMEISTER et al., 1992 e DENNIS et al., 1992 também detectaram resíduos de galactose nas porções glicolípídicas de antígeno de Tcra.

Outro experimento que também indicou a presença de glicoproteínas no antígeno heterólogo LV-Tcra foi através da menor reatividade observada com os soros imunes de coelho (fig. 4; 1) e LCR de paciente com NC com antígeno LV-Tcra após serem oxidados com ácido periódico (fig. 4, 3-6).

O antígeno T-Tso também foi avaliado quanto a composição de resíduos de açúcares, e pode-se observar que apenas o peptídeo 120kD de Tso foi identificado fracamente pela lectina BS-I (fig. 5-B; 3), permanecendo reativo na competição entre a lectina BS-I e galactose (fig. 5B; 4), indicando que o antígeno T-Tso não contém resíduos de galactose. Ao contrário dos nossos resultados, BAUMEISTER et al., 1992 detectaram resíduos de

galactose em antígeno de Tso e constataram reatividade cruzada entre esta fração e resíduos de galactose identificados em antígeno de Tcra. Esses resultados divergentes devem ser avaliados com cautela, uma vez que diferenças nos resultados da avaliação da composição de glicopeptídeos pode ser devido à variação na metodologia utilizada, pelo perfil proteína/glicoproteínas apresentado pelos parasitas nos diferentes estágios de evolução ou até mesmo na expressão de antígenos (JOSHUA et al., 1989).

A ConA identificou peptídeos de Tso (fig. 5-B; 6), e após a reação de competição entre ConA e glicose foi observado que os peptídeos 116, 94 e 54-46kD de Tso permaneceram reativos (fig. 5-B; 7). Observamos uma fraca reatividade dos peptídeos 14 e 12kD de Tso com a lectina ConA, e essa reatividade foi inibida pela adição de glicose (fig. 5-B; 6 e 7). É possível que o antígeno também seja constituído de manose, no entanto não podemos ter esta certeza por não ter sido feito teste de competição entre manose e ConA.

Os peptídeos de baixo peso molecular são aqueles que nos interessam neste estudo, e pudemos caracterizá-los como contendo resíduos de glicomanosídeo e galactose no antígeno LV-Tcra (20 e 18kD) e de glicomanosídeo no T-Tso (14 e 12kD).

Outra abordagem para caracterização dos antígenos foi a realização de blots com anticorpos policlonais de diferentes origens.

O soro hiperimune de coelho anti-LV-Tcra apresentou intensa reatividade com antígeno LV-Tcra na faixa <20kD (fig. 3-B;1). Quando utilizamos antígeno T-Tso no blot, os anticorpos presentes nesse soro também identificaram o peptídeo 12kD (fig. 3-A; 1). Pudemos observar também que peptídeos de baixo peso molecular de Tso (fig.3-A; 2) e de Tcra (fig.3-B; 2) não foram identificados por anticorpos presentes em amostras de coelho imunizado com E-Tso. É possível que o escólex não contenha esses peptídeos, embora a preparação de antígeno de escólex tenha sido utilizada com eficiência por NASCIMENTO et al., 1995.

Os peptídeos de Tso na faixa de 95-93 e 88-82, foram detectados por todos os soros de coelhos (fig.3-A), e os peptídeos 72 e 54 também apresentaram reatividade com soro normal de coelho (fig.3-A; 3). Estes peptídeos inespecíficos reconhecidos pelo soro normal de coelho foram previamente relatados por VAZ, 1993, reforçando a importância dos peptídeos de baixo peso molecular na diferenciação dos soros normal e hiperimune.

Nossos resultados mostraram que diferentes peptídeos de Tso na região de 94 a 25kD de Tso foram identificados por anticorpos presentes em soro de suíno com infecção natural por cisticercose, sendo que o peptídeo 14kD também apresentou reatividade com soro desses animais (fig. 3-C; 3 e 4). Reatividade específica entre antígeno de Tso e anticorpos anti-Tso presentes em soro de suíno também foi observada por TSANG et al., 1991 em animais infectados experimentalmente com ovos de Tso e por NASCIMENTO et al., 1995 em animais com infecção natural. Esses autores observaram que os peptídeos 105, 97, 85, 70, 50, 48, 42 e 13kD foram identificados pelos anticorpos presentes nos soros desses animais, similarmente ao obtido em nosso trabalho.

Utilizando antígeno de Tcra pode-se observar também que diferentes peptídeos de Tcra, entre 94 e 25kD foram identificados por anticorpos presentes nas amostras de suínos com cisticercose (Tso), e maior intensidade de reatividade foi observada com os peptídeos 14-12kD de Tcra (fig. 3-D; 3 e 4). Similarmente, outros autores observaram também reatividade cruzada entre anticorpos presentes em soro de suíno com cisticercose e antígeno de Tcra (PARKHOUSE & HARRISON, 1987, PINTO, 1998). HAYUNGA et al., 1991 também observaram que anticorpos anti-Tso de suíno imunizado com Tso reconheceram o peptídeo <12kD de LV-Tcra. Em nossas análises, o soro controle de suíno não apresentou reatividade inespecífica com os antígenos LV-Tcra e T-Tso (fig. 3-C e 3-D; 1 e 2).

A heterogeneidade da resposta imune na NC é confirmada pelos resultados observados em nossos experimentos. Por meio dos blots utilizando LCR de pacientes com NC e antígeno de Tso, observou-se diferentes padrões de reatividade com antígeno T-Tso (fig. 3-E; 3-5). GOTTSTEIN et al., 1986, e GOTTSTEIN et al., 1987, também observaram que diferentes peptídeos de Tso foram identificados por anticorpos presentes em LCR e soro de paciente com NC, sendo que os peptídeos 26 e 8kD não foram identificados por soros de pacientes portadores de infecção por *Echinococcus sp.*, e assim foram considerados específicos para cisticercose.

Além da reatividade específica observada em nossos experimentos entre antígeno de Tso e anticorpos presente em LCR de paciente com NC por blot, constatamos também reatividade cruzada desses anticorpos com o antígeno heterólogo, apresentando-se como intensa para os peptídeos abaixo de 20kD do antígeno de Tcra (fig. 3-F; 1 e 2). VAZ et al., 1997b também observaram reatividade cruzada entre anticorpos em paciente com NC e antígeno de Tcra, sendo que BUENO, 1999 além de ter observado este tipo de reatividade, ainda constatou imunodominância (94%) com peptídeos <20kD. KUNZ et al., 1989 já haviam relatado o peptídeo 19kD de Tcra como sendo imunodominante, sendo identificado por 78,5% dos soros de pacientes portadores de NC.

Da Avaliação da Cinética de Produção de Anticorpos

Para a escolha do melhor esquema de imunização, foi realizado o estudo da cinética dos anticorpos em camundongos imunizados com antígeno LV-Tcra. Utilizando antígeno de Tcra no ELISA-Tcra, observamos que os anticorpos IgM e IgG produzidos nos animais foram identificados a partir do 15^o dia após imunização nos grupos imunizados com 20µg (GII), 50µg (GIII) de LV-Tcra e com fração eluída <30kD-Tcra. Os anticorpos IgM apresentaram um segundo pico após o "booster" em GII e GIII, e os

anticorpos IgG persistiram em altos níveis em todos os grupos até mesmo no GIV (gel <30kD-Tcra), em que não foram detectados especificamente anticorpos IgM (fig. 6B e C). Provavelmente, a menor quantidade de proteína antigênica (LV-Tcra) que foi inoculada nos animais imunizados com gel<30kD-Tcra, ou até mesmo a maneira com o qual ele se apresentou ao sistema imunológico, não estimulou a produção de anticorpos IgM identificados por ELISA-Tcra. Foi a partir desta observação que decidimos pela inclusão do grupo VI, animais inoculados com eluato <30 kD-Tcra, dada a importância da fração antigênica <30 kD.

Anticorpos IgM e IgG também foram detectados especificamente por ELISA-Tso por CONTRAFATTO & PAMMENTER, 1988, em BALB/c imunizados com 50 ou 500µg de antígeno Tso, com pico de IgM no 37^o dia após imunização. No entanto, em nossos resultados houve um segundo pico de IgM após o "booster" nos animais do GII e GIII, diferente dos resultados obtidos por esses pesquisadores, que mesmo após 4 doses-"booster", não observaram um novo aumento nos níveis de anticorpos IgM. É possível que a segunda dose administrada nos animais de nossos experimentos, fez com que novos clones de linfócitos B secretores de anticorpos IgM fossem estimulados, aumentando os níveis desses anticorpos, caracterizando assim o segundo pico. Igualmente, nós também não observamos efeito dose-dependente entre os grupos imunizados com 20 ou 50µg de antígeno LV-Tcra.

Após observarmos que anticorpos IgM e IgG foram produzidos a partir do 15^o dia após imunização nos GII e GIII, decidimos pela inclusão do GV, animais imunizados com 50µg de LV-Tcra, sendo as amostras coletadas a partir do 5^o dia. O objetivo era verificarmos se anteriormente ao 15^o dia havia produção de anticorpos. Observamos que já no 5^o dia foram detectados anticorpos IgM, apresentando pico no 12^o dia, com redução nos níveis desses anticorpos nos dias seguintes; e os anticorpos IgG foram identificados a partir do 12^o dia (fig. 6B e 6C). Como não foi dado o "booster" nos animais deste grupo, não foi possível avaliar a produção de anticorpos após a segunda dose.

A produção de anticorpos IgG foi um sucesso em todos os grupos imunizados com antígeno de Tcra, independente da dose e tipo de preparação antigênica, ou seja, tanto o grupo imunizado com LV-Tcra como os imunizados com gel<30kD-Tcra ou com fração eluída <30kD-Tcra, estimularam a produção de anticorpos IgG anti-Tcra. GERVOKIAN et al., 1996, também identificaram por ELISA anticorpos IgG em soro de camundongos imunizados com Tcra.

Nos animais dos GIII, GIV e GVI foram detectados anticorpos IgA a partir do 15^o dia após imunização e os níveis foram aumentando após o "booster" (fig. 6-D). Ressaltemos que essa detecção de anticorpos IgA somente foi possível nas amostras diluídas 1:10, enquanto que para IgM e IgG foi utilizada diluição 1:500. A quantidade insuficiente de amostra dos animais do GII não permitiu fazer a avaliação deste isótipo de imunoglobulina nesses camundongos.

Em concordância com os resultados do ELISA-Tcra, todas as classes de imunoglobulinas apresentaram reatividade com os peptídeos 18 e 14-12kD de LV-Tcra nos animais imunizados com Tcra (fig. 11; 12 e 13). Os animais do GIV, cujo resultado do ELISA-Tcra foi negativo para os anticorpos IgM (fig. 6-B), apresentaram reatividade IgM com os peptídeos 18 e 14-12kD de LV-Tcra no blot (fig. 11; 12-16). Provavelmente, o modo pela qual os peptídeos estão expostos na membrana de nitrocelulose e a maior quantidade de antígeno de baixo peso molecular presente na faixa destes peptídeos identificados, pode ter favorecido este reconhecimento específico. Outro motivo que pode ter levado a não reatividade no ELISA, é o "pool" de diferentes peptídeos existente neste teste, sendo que no blot os peptídeos estão separados, favorecendo assim o reconhecimento específico.

A importância da resposta imune humoral para o desenvolvimento de vacinas e o efeito protetor de anticorpos em cisticercose foi reportado por PATHAK & GAUR, 1990 em suínos desafiados com ovos viáveis de Tso, após serem imunizados com antígeno de excreção e secreção de ovos de Tso. VALDEZ et al., 1994, relataram efeito protetor contra cisticercose murina, após imunizar os animais com gel contendo frações de 14-8kD de

Tcra, embora não tenham estudado a presença de anticorpos. Proteção contra o desenvolvimento de larvas de Tcra em camundongos foi também observada por MANOUTCHARIAN et al., 1996 em animais imunizados com antígenos recombinantes selecionados com anticorpos anti-56 e 74 kD de Tcra.

No blot do grupo controle observamos reatividade inespecífica dos anticorpos IgM (fig. 15; 22-26), IgG (fig. 16; 21-25) e IgA (fig. 17; 15-16) com os peptídeos de alto peso molecular 115, 94 e 70kD de Tso. Os anticorpos IgM do grupo controle reagiram inespecificamente com o peptídeo 94 kD de Tcra (Fig.11; 23-27). Em nossos experimentos não foi observado o "background" (reação de fundo). Já HAYUNGA et al., 1991 observaram "background" e relatam que é causado por componentes do hospedeiro presentes nas preparações antigênicas de *Taenia hydatigena* utilizada para fazer o blot.

A avaliação da resposta específica dos animais imunizados com Tso foi feita por ELISA utilizando conjugado anti-Ig-total-camundongo, e mostrou que esses animais apresentaram anticorpos nas amostras analisadas, com intensa reatividade até a última coleta de soro (fig. 8-A). Esses anticorpos apresentaram uma forte reatividade específica com os peptídeos 60kD, 40-35, 28, 25, 22, 18 e 12kD de Tso entre o 15^o e 39^o dia após imunização (fig. 18, 1-5). O emprego de conjugado anti-Ig-total deve ter identificado as várias classes de imunoglobulina responsáveis por esta resposta homóloga intensa. A grande variedade de frações antigênicas no preparado pode ter favorecido o reconhecimento de grande número de bandas.

Os nossos estudos mostraram que os anticorpos IgM anti-Tso foram detectados a partir do 5^o dia, IgG a partir do 15^o dia, aumentando o título com o decorrer do tempo, apresentando um nível máximo de aparecimento destes anticorpos após o "booster" (fig. 8-A). Os anticorpos IgM anti-Tso presentes nos soros dos animais imunes reconheceram especificamente os peptídeos 60, 43, 39, 30, 28, 25 e 12 kD de T-Tso fracamente a partir do 5^o dia após imunização, e a intensidade da reatividade foi aumentando com o

decorrer do tempo (fig. 18, 6-10); as imunoglobulinas IgG identificaram os peptídeos 75, 67, 60, 40-35, 18 e 12kD de Tso no 15^o dia, com ligeiro aumento na intensidade de reatividade nos 30^o e 39^o dia, e aparecimento dos peptídeos 47, 45 e 25kD (fig. 18, 11-15). Similarmente nos estudos de MONTENEGRO et al., 1994 anticorpos IgG em soros de pacientes com NC identificaram os peptídeos 50, 42, 24, 21, 18, 14 e 13kD de Tso, por meio de ensaios de imunoprecipitação.

Estudando blot-Tso com soro de suíno infectado experimentalmente com ovos de Tso, TSANG et al, 1991 observaram reatividade de anticorpos IgM anti-gp97 para peptídeos de Tso no 7^o dia, que não foram mais detectados a partir do 42^o dia e anticorpos IgG anti-gp50 e gp42 no 35^o dia, persistindo até o 91^o dia. Ao contrário, em nossos experimentos os anticorpos IgM identificaram os peptídeos 60, 43, 39, 30, 28, 25 and 12 kD de T-Tso a partir do 5^o dia (fig. 18, 6-10) e os anticorpos IgG identificaram os peptídeos 75, 67, 60, 40-35, 18 e 12kD de Tso a partir do 15^o dia (fig. 18, 11-15).

Os animais imunizados com Tso também apresentaram anticorpos IgA com reatividade para o antígeno T-Tso. A presença de anticorpos IgA anti-Tso nesse grupo foi analisada antes da imunização (tempo zero) e no 39^o e 50^o dia após a imunização, por não haver disponibilidade de amostras de outras coletas. Quando analisadas por ELISA-Tso, foi observado aumento na produção de anticorpos do isotipo IgA após o "booster" e sem diferença na reatividade entre o 39^o e 50^o dia após imunização (fig.7-A). Os anticorpos IgA anti-Tso reconheceram especificamente os peptídeos 45 , 40-35, 28-25 e 18 kD de Tso no 39^o dia (Fig. 18, 16-18).

Da Avaliação da Reatividade Cruzada

A análise da reatividade cruzada mostrou que os camundongos imunizados com Tcra apresentaram anticorpos IgM, IgG e IgA que reagiram cruzadamente com antígeno de Tso (fig. 7-B; C e D), exceto o GVI que não apresentou anticorpos IgG e o grupo IV que não apresentou anticorpos IgM

e IgG identificados por ELISA-Tso.

A análise da dose de antígeno mostrou que a quantidade de 20µg de LV-Tcra já é suficiente para obtenção de anticorpos do isotipo M e G de reatividade cruzada para antígeno de Tso.

O GV, incluído para verificar a resposta dos anticorpos anteriormente ao 15^o dia após imunização, mostrou no ELISA-Tso, anticorpos IgM a partir do 5^o dia, não apresentando um pico no 12^o dia como foi observado no ELISA-Tcra. Já os anticorpos IgG produzidos nos animais deste grupo apresentaram uma resposta no ELISA-Tso semelhante a resposta homóloga, ou seja, com anticorpos identificados a partir do 12^o dia.

Os anticorpos IgM presentes nas amostras de soros do GII, GIII e GVI identificaram fracamente o peptídeo 30kD (fig. 15; 2-6; 17-21) e os anticorpos IgM do GIV identificaram os peptídeos 60, 43, 30 e 12kD de Tso (fig. 15; 12-16). Provavelmente, essa baixa reatividade dos anticorpos IgM com peptídeos <20kD se deve a perda do líquido vesicular das larvas de Tso no momento da retirada dos cisticercos dos músculos dos suínos, uma vez que ele é rico em peptídeos de baixo peso molecular.

Já os anticorpos IgG presentes nas amostras de todos os grupos imunizados com Tcra identificaram cruzadamente o peptídeo 12kD de Tso (fig. 16), inclusive nos grupos GIV e GVI que não apresentaram anticorpos IgG por ELISA-Tso (fig. 7-B). A elevada quantidade de anticorpos IgG nos animais imunizados pode ter favorecido o reconhecimento do peptídeo 12kD de Tso, apesar da baixa concentração de peptídeos de baixo peso molecular nesse antígeno. HAYUNGA et al., 1991 observaram que anticorpos IgG de soro de suínos imunizados com Tso, de soro de gado imunizado com *Taenia saginata* e de soro humano com cisticercose, reconheceram cruzadamente peptídeos <12kD de líquido vesicular de *Taenia hydatigena*, e os anticorpos IgG do soro de suíno também identificaram peptídeos <12 kD de LV-Tcra.

A imunização dos animais com gel <30kD-Tcra não resultou na produção de anticorpos IgM identificados por ELISA-Tcra e IgM e IgG identificados no ELISA-Tso. Também o grupo imunizado com fração eluída <30kD-Tcra não apresentou anticorpos IgG identificados no ELISA-Tso. No

entanto, por meio de blot, peptídeos de Tcra e Tso foram identificados pelos anticorpos IgM e IgG desses grupos. Pode ser que a identificação dos peptídeos deve-se à produção de anticorpos mais específico para os peptídeos submetidos ao SDS-PAGE.

Os anticorpos IgA presentes nos soros dos animais do GIII, GIV e GVI identificaram cruzadamente os peptídeos 65, 50, 30 e 12kD de Tso. TSANG et al., 1991, estudando suínos infectados com Tso também obtiveram pobres resultados de anticorpos IgA por meio de blot utilizando antígeno de Tso

Analizamos também a reatividade cruzada dos anticorpos anti-Tso nos animais do GVII com antígeno LV-Tcra. Os anticorpos produzidos nesses animais, reconheceram cruzadamente o antígeno de Tcra (fig. 8-B), e apesar de terem apresentado menor intensidade quando comparada a resposta específica, sua cinética de reatividade cruzada foi semelhante à da resposta homóloga, exceto para os anticorpos IgM que após o "booster" foi observado um novo estímulo na produção desses anticorpos, fato este não observado no ELISA-Tso (fig. 8-A). Os anticorpos IgM apresentaram reatividade com os peptídeos 72, 35, 30, 24, e 14kD (Fig. 19, 1-4), os anticorpos IgG reagiram com os peptídeos 95, 70, 50, 30, 18 e 14 kD (Fig. 19, 5-8).

VAZ et al., 1997a e LARRALDE et al., 1990 estudaram anticorpos IgG anti-Tso em LCR de pacientes com NC e verificaram que os anticorpos IgG também apresentaram reatividade cruzada com LV-Tcra, com intensidade similar quando utilizaram antígeno de Tso. VAZ et al., 1997b, observaram que anticorpos em LCR de paciente com NC foram reativos com os peptídeos 95-92 e 72-68 kD de LV-Tcra. Reatividade cruzada também foi observada por MONTENEGRO et al., 1994, entre anticorpos IgG anti-Tso em soro de paciente com cisticercose e antígenos de *Hymenolepis nana* e de *Echinococcus granulosus* por meio de ELISA. Também relataram que anticorpos nos soros dos pacientes com *H. nana* identificaram cruzadamente os peptídeos 48, 23 e 21kD de Tso e anticorpos presentes em soros humanos com *E. granulosus* identificaram os peptídeos 120, 105, 62, 40, 17,

13 e 12kD de Tso.

Em nossas análises também observamos que anticorpos IgA presentes nos soros dos animais do GVII reconheceram os peptídeos 70, 37, 35, 30, 18 e 14kD de LV-Tcra (Fig. 19, 9-11).

De modo geral, a reatividade cruzada dos anticorpos anti-Tso com os antígenos Tcra foi menos intensa, e às vezes, detectada mais tardiamente, requerendo o uso de diluições menores das amostras. Essa menor intensidade era esperada, pois alguns antígenos são exclusivos de cada parasita e aqueles antígenos responsáveis pela reatividade cruzada estão presentes em concentração diferente em cada um deles. Essas diferenças pode afetar tanto o processo de imunização como a eficiência dos testes de detecção dos anticorpos.

O resultado do ELISA após a retirada de IgG do soro do P₆₀ do GIV em cromatografia de afinidade com Shepharose 4B-Proteína A, mostrou que o título de IgA não aumentou na amostra tratada. O experimento deveria ter sido realizado também em amostras com níveis baixos ou indetectáveis de IgA. Apesar disso, nossos resultados utilizando os soros disponíveis diluídos 1:10 (fig. 6-D, 7-D e 8) mostraram-se adequados para análise da cinética dos anticorpos IgA.

A escolha do antígeno LV-Tcra para imunizar os camundongos é justificada por ser um antígeno obtido de parasitas mantidos em BALB/c, de fácil obtenção e pode substituir o parasita da infecção humana e suína (Tso). Além disso é rico em peptídeos <20 kD considerados imunodominantes.

Todo o estudo realizado com os anticorpos dos animais imunizados, permitiu observar que a triagem dos clones híbridos para a produção de anticorpos monoclonais deve ser feito com conjugados específicos dependendo do isotipo de imunoglobulina desejado, que está subordinado ao esquema de imunização utilizado. Também permitiu observar o pico de produção de anticorpos IgM, IgG e IgA, propiciando a escolha do dia em que

devem ser retiradas as células esplênicas com maior chance de obtenção de anticorpos de reatividade cruzada, objetivo principal de nossos estudos.

Da Produção de Anticorpos Monoclonais

Foi escolhido o GIII, inoculado com 50µg de LV-Tcra, para a fusão celular por ter apresentado excelente reatividade dos anticorpos IgM, IgG e IgA com antígeno LV-Tcra e T-Tso em ELISA.

A fusão celular foi realizada com esplenócitos colhidos 40^o dia após o início da imunização, período em que os animais apresentaram uma melhor resposta para as três classes de imunoglobulinas, detectadas por ambos os antígenos (Tcra e Tso) por meio de ELISA e blot.

Após a fusão celular das células esplênicas de animais imunizados com 50µg de LV-Tcra e com células de mieloma P₃X₆₃-Ag8.653, os clones produzidos apresentaram bom crescimento celular, permitindo o início da seleção dos hibridomas por ELISA. No 9^o dia após a fusão foram observadas microscopicamente células híbridas em crescimento, e o resultado do ELISA confirmou que os clones secretavam imunoglobulinas com reatividade para antígenos LV-Tcra e T-Tso. O ELISA utilizando conjugado anti-Ig-total mostrou que na placa 3 houve produção de 73 clones secretores de anticorpos que identificaram antígeno Tcra; desses, 48 reconheceram antígeno de Tso (fig. 20 e 21). Foi observado também no 11^o dia após a fusão que dos 73 clones que identificaram antígeno LV-Tcra quando utilizamos conjugado anti-Ig-total, um total de 64 clones secretaram anticorpos IgG que reconheceram antígeno LV-Tcra (fig. 20), dos quais 5 reconheceram cruzadamente antígeno de Tso (fig. 21), ou seja, os clones 21, 24, 44, 45 e 56 apresentaram reatividade IgG anti-Tcra e anti-Tso.

O ELISA da placa 4 mostrou a ocorrência de 36 clones com produção de anticorpos IgM que identificavam antígeno LV-Tcra (fig. 22). Na mesma placa foram identificados 40 clones que apresentavam resposta IgM anti-Tso (fig. 23), sendo destes, 33 também com reatividade IgM anti-Tcra e 7

reconhecendo apenas antígeno Tso.

A quantidade de anticorpos monoclonais IgM anti-Tcra obtidos em nossos experimentos pode ser considerada elevada, quando comparada com os dados relatados por outros pesquisadores. BRANDT et al., 1992 ao utilizarem camundongos BALB/c imunizados com antígeno de secreção e excreção de *T. saginata*, obtiveram 8 anticorpos monoclonais; e dois desses identificaram o mesmo tipo de antígeno em soro bovino por meio de ELISA. Utilizando dois anticorpos monoclonais IgM anti-Tso, RODRIGUEZ-DEL-ROSAL et al., 1989 identificaram antígenos de Tso em soro de suíno com cisticercose por meio de teste da captura.

CORREA et. al., 1989b, utilizaram um anticorpo monoclonal IgM anti-Tso para identificar antígeno em soro de suíno com cisticercose e em LCR de paciente com NC por meio de ensaio imunoenzimático de captura. Já HARRISON et al., 1989, utilizaram um anticorpo monoclonal IgM anti-Tso para pesquisar cruzadamente antígeno de *T. saginata* em soro de gados com cisticercose.

A placa 4, ainda, apresentou 53 clones secretores de anticorpos IgG que identificaram antígenos de Tcra (fig. 22), dos quais 5 sintetizavam anticorpos IgG que reconheciam também antígeno T-Tso (fig. 23). Diferentemente, LIU et al., 1991 relataram obtenção de 4 anticorpos monoclonais IgG a partir de antígeno de líquido vesicular de cisto hidático de *E. granulosus* que competiram especificamente com anticorpos de soro de paciente com hidatidose por ELISA. MONTENEGRO & MIRANDA, 1996 imunizaram camundongos BALB/c com ovos de Tso e obtiveram 6 clones híbridos secretores de anticorpos IgG, identificados por meio de ELISA utilizando antígeno homólogo. Desses 6 produtos híbridos, apenas um clone produtor de anticorpos IgG pode ser utilizado para distinguir ovos de Tso e *T. saginata*.

CHANG-YAN et al., 1992 também obtiveram anticorpos monoclonais IgG anti-Tso e os utilizaram para pesquisar especificamente antígeno de Tso em LCR de paciente com NC.

Anticorpo monoclonal IgG anti-Tso foi também obtido por AMBROSIO

et al., 1997 para identificar antígenos de Tso e cruzadamente antígeno de *T. saginata* e *T. taeniaeformis* por meio de ELISA e imunofluorescência.

Em nosso estudo foi observado que a quantidade de clones secretores de anticorpos IgM anti-Tcra com reatividade cruzada com o antígeno T-Tso foi maior que a dos clones produtores de anticorpos IgG. Ao contrário, BRANDT et al., 1992, obtiveram 2 anticorpos monoclonais IgM anti-*T. saginata* de reatividade cruzada com antígeno de *T. ovis*, Tso e de *T. hydatigena*, e ainda nos dados de RODRIGUEZ-DEL-ROSAL et al., 1989 foram relatados dois anticorpos monoclonais IgM anti-Tso de reatividade cruzada com antígeno de *T. saginata*.

Observou-se na placa 4, que algumas cavidades apresentaram clones secretores de anticorpos IgM e clones secretores de IgG (fig. 24), que por meio de diluição limitante poderiam ser separadas individualmente cada célula híbrida secretora de um isotipo de anticorpo com especificidade definida.

Concluimos que o ELISA utilizando sobrenadante das células híbridas das placas 3 e 4 detectou um total de 36 clones secretores de IgM e 117 clones secretores de IgG que identificaram antígeno de Tcra e 40 clones secretores de IgM e 10 clones secretores de IgG que identificaram Tso.

Após a triagem dos clones secretores de anticorpos IgM e clones secretores de anticorpos IgG foram selecionados 72 clones para fazer a expansão celular em placas de 24 cavidades. Desses clones, 16 apresentavam elevado crescimento celular, sendo portanto selecionados para fazer ELISA. A análise mostrou que os clones identificaram antígeno LV-Tcra e, também, reagiram cruzadamente com antígeno T-Tso (figura 25). Observou-se que os clones 3 e 4 (placa 3) e 8 e 21 (placa 4) apresentaram maior intensidade de reatividade com antígeno Tso quando comparando com Tcra.

O clone 7 da placa 3 foi selecionado para o ensaio de blot por ter secretado anticorpos IgG anti-Tcra (fig. 22) e por apresentar reatividade com antígenos Tcra e Tso (fig. 20 e 21). O clone 33 dessa mesma placa foi selecionado por ter reconhecido antígenos Tcra e Tso (fig. 20 e 21) e,

também, pelo seu elevado crescimento celular após a transferência para a placa de 24 cavidades. Os anticorpos dos clones 7 e 33 reconheceram os peptídeos 18 e 14-12kD de Tcra (fig. 26).

Por outro lado, sabendo que anticorpos monoclonais anti-Tso podem ser utilizados para obtenção de antígenos específicos de Tso por imunoafinidade (NASCIMENTO, et al., 1987), podemos também utilizar os anticorpos monoclonais específicos obtidos na purificação imunoquímica de antígenos de reatividade cruzada do modelo experimental para estudos da NC.

O nosso trabalho relata a primeira obtenção de clones produtores de anticorpos monoclonais anti-Tcra de reatividade com antígenos presentes em Tso por ELISA. Esses clones poderão ser estabilizados e utilizados futuramente na pesquisa de antígenos na cisticercose humana e suína. Ademais, esses reagentes imunobiológicos poderão ser empregados como ferramentas, auxiliando o diagnóstico e a elucidação dos mecanismos imunopatogênicos da relação parasita-hospedeiro na NC humana.

CONCLUSÕES

- Pelos dados obtidos no presente estudo, observamos que anticorpos anti-LV-Tcra presente em soro de coelho, anti-Tso em suíno e em LCR de pacientes com NC apresentaram reatividade com os peptídeos de Tso, além da reatividade cruzada com peptídeos de Tcra; os anticorpos anti-Tso apresentaram maior reatividade com os peptídeos menores que 20kD de LV-Tcra.

- Os antígenos de Tcra e de Tso utilizados para imunizar os camundongos foram capazes de estimular o sistema imune do animal, induzindo a produção de anticorpos. Uma maior reatividade foi observada entre anticorpos IgG presente nas amostras dos animais e peptídeos <30kD.

- Foram obtidos 36 clones secretores de IgM e 117 clones secretores de IgG que identificaram antígenos de Tcra, 40 clones secretores de IgM e 10 clones secretores de IgG que identificaram antígeno de Tso.

- Os clones 7 e 33 foram caracterizados por blot-Tcra e reconheceram os peptídeos 18 e 14-12kD de Tcra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, P.G., KNOST, J.A., CLARKE, G., WILBURN, S., OLDHAM, R.K., FOON, K.A. Determination of the optimal human cell lines for development of human hybridomas. *J. Immunol.*, Baltimore, v.131, n.3, p.1201-1204, 1983.
- ACOSTA, E. Antibodies to the metacestode of *Taenia solium* in the saliva from patients with neurocysticercosis. *J. Clin. Lab. Anal.*, New York, v.4, p.90-94, 1990.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 3.ed. New York: Garland Publishing, 1994. p.187-188.
- ALSMADI, O., TILLEY, S.A. Antibody-dependent cellular cytotoxicity directed against cells expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope of primary or laboratory-adapted strains by human and chimpanzee monoclonal antibodies of different epitope especificities. *J. Virol.*, Washington, v.72, n.1, p.286-293, 1998.

De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 1999 [CD-ROM].

- AMBROSIO, J., CRUZ-RIVERA, M., ALLAN, J., MORÁN, E., ERSFELD, K., FLISSER, A. Identification and partial characterization of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*, London, v.114, p.545-553, 1997.
- AUDIBERT, F.M., LISE, L.D. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol. Today*, Barking, v.14, n.6, p.281-284, 1993.
- AZMI, F.H., LUCAS, A.H., RAFF, H.V., GRANOFF, D.M. Variable region sequences and idiotypic expression of a protective human immunoglobulin M antibody to capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* group B and *Escherichia coli* K1. *Infect. Immun.*, Washington, v.62, n.5, p.1776-1786, 1994.
- BAARS, J.H., DE RUIJTER, J., SMEDTS, F., NIEKERK, C.C.V., POELS, L.G., SELDENRIJK, C.A., RAMAEKERS, F.C.S. The applicability of a keratin 7 monoclonal antibody in routinely papanicolaou-stained cytologic specimens for the differential diagnosis of carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*, Philadelphia, v.101, p.257-261, 1994.
- BAUMEISTER, S., DENNIS, R.D., KUNZ, J., WIEGANDT, H., GEYER, E. Comparative serological reactivity of *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* and *Taenia saginata* metacestode neutral glycolipids to infection serum from *Taenia crassiceps*-infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.53, p.53-62, 1992.
- BAZIN, R., LEMIEUX, R. Role of the macrophage-derived hybridoma growth factor in the in vitro and in vivo proliferation of newly formed B cell hybridomas. *J. Immunol.*, Baltimore, v.139, n.3, p.780-787, 1987.
- BERZOFSKY, J.A., BERKOWER, I.J., EPSTEIN, S.L. Antigen-antibody interactions and monoclonal antibodies. In: WILLIAN, E.P. **Fundamental immunology**. 3.ed. New York: Raven Press, 1993. p.421-465.

- BEYER, C.F. A "dot-immunobinding assay" on nitrocellulose membrane for the determination of the immunoglobulin class of mouse monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.67, p.79-87, 1984.
- BIBB, W.F., ARNOW, P.M., THACKER, L., MCKINNEY, R.M. Detection of soluble *Legionella pneumophila* antigens in serum and urine specimens by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.20, n.3, p.478-482, 1984.
- BOSOMPEM, K.M., AYI, I., ANYAN, W.K., ARISHIMA, T., NKRUMAH, F.K., KOJIMA, S. A monoclonal antibody-based dipstick assay for diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.91, p.554-556, 1997.
- BRANDT, J.R.A., GEERTS, S., DE DEKEN, R., KUMAR, V., CEULEMANS, F., BRIJS, L., FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.22, n.4, p.471-477, 1992.
- BUENO, E.C. Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*. São Paulo, 1999. (Tese de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- BULLIDO, R., DOMÉNECH, N., ALVAREZ, B., ALONSO, F., BABÍN, M., EZQUERRA, A., ORTUÑO, E., DOMÍNGUEZ, J. Characterization of five monoclonal antibodies specific for swine class II major histocompatibility antigens and crossreactivity studies with leukocytes of domestic animals. *Dev. Comp. Immunol.*, Tarrytown, v.21, n.3, p.311-322, 1997.
- CAESAR-TONTHAT, T.C., CUTLER, J.E. A monoclonal antibody to *Candida albicans* enhances mouse neutrophil candidacidal activity. *Infect. Immun.*, Washington, v.65, n.12, p.5354-5357, 1997.

- CALICH, V.L.G., VAZ, C.A.C. *Immunologia básica*. São Paulo: Artes Médicas, 1989. p.57.
- CARDOSO, M.S., SIEMONEIT, K., STURM, D., KRONE, C., MORADPOUR, D., KUBANEK, B. Isolation and characterization of human monoclonal antibodies against hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J. Med. Virol.*, New York, v.55, p.28-34, 1998.
- CHANG-YUAN, W., HONG-HUA, Z., LING-YUN, G. A MAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. *Hybridoma*, New York, v.11, n.6, p.825-827, 1992.
- CHIBA, J., NAKANO, M., SUZUKI, Y., AOYAMA, K., OHBA, H., KOBAYASHI, T., YASUDA, A., KOJIMA, A., KURATA, T. Generation of neutralizing antibody to the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 by immunizing of mice with an infectious vaccinia virus recombinant. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.207, p.53-60, 1997.
- CHOROMANSKI, L., ESTRADA, J.J., KUHN, R.E. Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.76, n.1, p.69-73, 1990.
- CHYE, S., YEN, C., CHEN, E. Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies for immunodiagnosis of angiostrongyliasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.56, n.4, p.408-412, 1997.
- CLAASSEN, I., OSTERHAUS, A. The iscom struture as an immune-enhancing moiety: experience with viral systems. *Immunology*, Oxford, v.143, p.531-541, 1992.
- COLLINS, R.A., JONES, B.V., OLDHAM, G. Production of bovine immunoregulatory molecules by xenogeneic hybrids. *Immunology*, Oxford, v.71, p.266-270, 1990.

- CONTRAFATTO, G., PAMMENTER, M.D. Immunization procedure-related immunoglobulin levels in the development of antibodies against *Cysticercus cellulosae*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, Pretoria, v.55, p.169-172, 1988.
- CORREA, M.D., PLANCARTE, A., SANDOVAL, M.A., RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., MEZA-LUCAS, A., FLISSER, A. Immunodiagnosis of human and porcine cysticercosis. Detection of antibodies and parasite products. *Acta Leidensia*, Leiden, v.57, n.2, p.93-99, 1989a.
- CORREA, D., SANDOVAL, M.A., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., PLANCARTE, A., MEZA-LUCAS, A., FLISSER, A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.83, p.814-816, 1989b.
- COSSIO, M.E.F., OHLIN, M., LLANO, M., SELANDER, B., CRUZ, S., VALLE, J.D., BORREBAECK, C.A.K. Human monoclonal antibodies against an epitope on the class 5c outer membrane protein common to many pathogenic strains of *Neisseria meningitidis*. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.166, p.1322-1328, 1992.
- DANILOV, S., SAVOIE, F., LENOIR, B., JEUNEMAITRE, X., AZIZI, M., TARNOW, L., ALHENC-GELAS, F. Development of enzyme-linked immunossays for human angiotensin I converting enzyme suitable for large-scale studies. *J. Hypertens.*, London, v.14, n.6, p.719-727, 1996.
- DE-GASPARI, E.N., UMEZAWA, E.S., ZINGALES, B., STOLF, A.M.S., COLLI, W., ABRAHAMSOHN, I.A. *Trypanosoma cruzi*: serum antibody reactivity to the parasite antigens in susceptible and resistant mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.85, p.261-270, 1990.

- DE-GASPARI, E.N., RIBEIRO-FILHO, A.A., ZOLLINGER, W.D. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, v.27, p.2889-2893, 1994.
- DE LEIJ, L., POPPEMA, S., THE, T.H. Cryopreservation of newly formed hybridomas. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.62, p.69-72, 1983.
- DENNIS, R.D., BAUMEISTER, S., GEYER, R., PETER-KATALINIC, J., HARTMANN, R., EGGE, H. Glycosphingolipids in cestodes. Chemical structures of ceramide monosaccharide, disaccharide, trisaccharide and tetrasaccharide from metacestodes of fox tapeworm, *Taenia crassiceps* (cestoda: cyclophyllidea). *Eur. J. Biochem.*, New York, v.207, p.1053-1062, 1992.
- DRAELANTS, E., HOFKENS, E., HARDING, E., BRANDT, J., GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. *Res. Vet. Sci.*, London, v.58, p.99-100, 1995.
- DUPUIS, M., MURPHY, T.J., HIGGINS, D., UGOZZOLI, M., NEST, G.V., OTT, G., McDONALD, D.M. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell. Immunology*, Orlando, v.186, p.18-27, 1998.
- ERB, K., HAU, J. Monoclonal and polyclonal antibodies. In: SVENDSEN, P., HAU, J. ***Handbook of laboratory animal science***. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.8, p.293-309.
- ESTRADA, J.J., KUHN, R.E. Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.*, Amsterdam, v.71, p.39-48, 1985.

- ESTRADA, J.J., ESTRADA, J.A., KUHN, R.E. Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.41, n.1, p.50-55, 1989.
- FELDMAN, M., PLANCARTE, A., SANDOVAL, M., WILSON, M., FLISSER, A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.84, p.559-562, 1990.
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Can. J. Zool.*, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.
- FISCHER, C., NOSRATIAN, R., HABTEMICHAEL, N., TOLLE, R., RIEMENSCHNEIDER, V., GEYER, E. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. *Trop. Med. Parasitol.*, New York, v.45, p.324-328, 1994.
- FRIEDMAN, A. Induction of immune response to protein antigens by subcutaneous co-injection with water-miscible vitamin A derivatives. *Vaccine*, Guildford, v.9, p.122-128, 1991.
- GEVORKIAN, G., MANOUTCHARIAN, K., LARRALDE, C., HERNANDEZ, M., ALMAGRO, J.C., VIVEROS, M., SOTELO, J., GARCIA, E., SCIUTTO, E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Lett.*, Amsterdam, v.49, p.185-189, 1996.
- GODING, J.W. Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.39, p.285-308, 1980.

- GOLDSTEIN, L.C., McDOUGALL, J., HACKMAN, R., MEYERS, J.D., THOMAS, E.D., NOWINSKI, R.C. Monoclonal antibodies to cytomegalovirus: rapid identification of clinical isolates and preliminary use in diagnosis of cytomegalovirus pneumonia. *Infect. Immun.*, Washington, v.38, n.1, p.273-281, 1982.
- GÓMEZ, J.A., CRIADO, M.T., FERREIRÓS, C.M. Bactericidal activity of antibodies elicited against the *Neisseria meningitidis* 37-kDa ferric binding protein (FbpA) with different adjuvants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Amsterdam, v.20, p.79-86, 1998.
- GOTTSTEIN, B., TSANG, V.C.W., SCHANTZ, P.M. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.35, n.2, p.308-313, 1986.
- GOTTSTEIN, B., ZINI, D., SCHANTZ, P.M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop. Med. Parasit.*, New York, v.38, p.299-303, 1987.
- GROGL, M., ESTRADA, J.J., MACDONALD, G., KUHN, R.E. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.71, n.4, p.433-442, 1985.
- GROTH, S.F., SCHEIDEGGER, D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.35, p.1-21, 1980.
- GUPTA, R.K., RELYVELD, E.H., LINDBLAD, E.B., BIZZINI, B., BENEFRAIM, S., GUPTA, C.K. Adjuvants a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*, Guildford, v.11, n.3, p.293-306, 1993.
- GUPTA, R.K., SIBER, G.R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, Guildford, v.13, n.14, p.1263-1276, 1995.

- HALLA, J.T., SCHROHENLOHER, R.E., VOLANAKIS, J.E. Immune complexes and other laboratory features of pleural effusions. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.92, p.748-752, 1980.
- HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory, 1988. 726p.
- HARRISON, L.J.S., JOSHUA, G.W.P., WRIGHT, S.H., PARKHOUSE, R.M.E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.11, p.351-370, 1989.
- HAYUNGA, E.G., SUMNER, M.P., RHOADS, M.L., MURRELL, K.D., ISENSTEIN, R.S. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia spp.* cyst fluid. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v.52, n.3, p.462-470, 1991.
- HEATH, A.W., PLAYFAIR, J.H.L. Cytokines as immunological adjuvants. *Vaccine*, Guildford, v.10, n.7, p.427-434, 1992.
- HOUSTON, B, O'NEILL, I.E., MITCHELL, M.A., GODDARD, C. Purification and biological activity of a single charge isomer of pituitary-derived chicken growth hormone. *J. Endocrinol.*, London, v.125, p.207-215, 1990.
- ICHIHARA, T., SAKAMOTO, J., NAKAO, A., FURUKAWA, K., WATANABE, T., SUZUKI, N., HORISAWA, M., NAGURA, H., LLOYD, O.K., TAKAGI, H. Expression of blood group-related antigens in normal and malignant pancreatic tissue correlated with genotype of the patient defined by saliva glycoprotein. *Cancer*, Philadelphia v.71, n.1, p.71-81, 1993.
- JAMES, K., BELL, G.T. Human monoclonal antibody production current status and future prospects. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.100, p.5-40, 1987.

- JEFFERIS, R., REIMER, C.B., SKVARIL, F., De LANGE, G., LING, N.R., LOWE, J., WALKER, M.R., PHILLIPS, D.J., ALOISIO, C.H., WELLS, T.W., VAERMAN, J.P., MAGNUSSON, C.G., KUBAGAWA, H., COOPER, M., VARTDAL, F., VANDVIK, B., HAAIJMAN, J.J., MAKELA, O., SARNESTO, A., LANDO, Z., GERGELY, J., RAJNAVÖLGVI, E., LÁSZLÓ, G., RADL, J., MOLINARO, G.A. Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an iuis/who collaborative study. *Immunol. Lett.*, Amsterdam, v.10, p.223-252, 1985.
- JOSHUA, G. W.P., HARRISON, L.J.S., SEWELL, M.M.H. Developmental changes in proteins and glycoproteins revealed by direct radio-iodination of viable *Taenia saginata* larvae. *Parasitology*, London, v.99, p.265-274, 1989.
- KARIM, M.J., BASAK, S.C., TREES, A.J. Characterization and immunoprotective properties of a monoclonal antibody against the major oocyst wall protein of *Eimeria tenella*. *Infect. Immun.*, Washington, v.64, n.4, p.1227-1232, 1996.
- KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B., RAJEWSKY, K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.*, Baltimore, v.123, n.4, p.1548-1550, 1979.
- KERCKHOVEN, I.V., VANSTEENKISTE, W., CLAES, M., GEERTS, S., BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.76, p.269-274. 1998.
- KILMARTIN, J.V., WRIGHT, B., MILSTEIN, C. Rat monoclonal antitubulin antibodies derived by using a new nonsecreting rat cell line. *J. Cell. Biol.*, New York, v.93, p.576-582, 1982.

- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, London, v.256, p.495-497, 1975.
- KÖHLER, G. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Nobel Lectures*, p.120-129, 1984.
- KONNO, T., SUZUKI, H., IMAI, A. Reovirus-like agent in acute epidemic gastroenteritis in *Japanese infants*: fecal shedding and serologic response. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.135, n.2, p.259-266, 1977.
- KUNZ, J., KALINNA, B., WATSCHKE, V., GEYER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentrabl. Bakteriол.*, Stuttgart, v.271, p.510-520, 1989.
- KUNZ, J., BAUMEISTER, S., DENNIS, R.D., KÚYTZ, B., WEIGANDT, H., GEYER, E. Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.77, p.443-447, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LANE, R.D. A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.81, p.223-228, 1985.
- LANE, H., O'LOUGHLIN, S., POWELL, F., MAGEE, H., DERVAN, P.A. A quantitative immunohistochemical evaluation of lentigo maligna and pigmented solar keratosis. *Am. J. Clin Pathol.*, Philadelphia, v.100, p.681-685, 1993.

- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R.M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAZ, M.L., SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Chicago, v.114, p.926-928, 1990.
- LAVERDA, D., BYRNE, G.I. Use of monoclonal antibodies to facilitate identification, cloning, and purification of *Chlamydia trachomatis* hsp 10. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.35, n.5, p.1209-1215, 1997.
- LEDBETTER, J.A., HERZENBERG, L.A. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.* Copenhagen, v.47, p.63-90, 1979.
- LI, J., CHEN, J., OUYANG, M., CHAO, S., PENG, Y., LIN, L., CHANG, W., LI, Y. Immunization strategies for the production of rat monoclonal anti-idiotope antibodies. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.142, p.15-20, 1991.
- LIU, D., LIGHTOWLERS, M.W., RICKARD, M.D. Evaluation of a monoclonal antibody-based competition ELISA for the diagnosis of human hydatidosis. *Parasitology*, London, v.104, p.357-361, 1992.
- LIU, D., RICKARD, M.D., LIGHTOWLERS, M.W. Analysis of taeniid antigens using monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B. *Parasitol. Res.*, Berlin, v.79, p.82-85, 1993.
- LIVRAMENTO, J.A., MACHADO, L.R., SPINA-FRANÇA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: FEJERMAN, N., CHAMOLES, N. A., eds. **New trends in pediatric neurology**. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. p.307-312.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

- LUNDY, J., LOZOWSKI, M., MISHRIKI, Y. Monoclonal antibody B72.3 as a diagnostic adjunct in fine needle aspirates of breast masses. *Ann. Surg.*, Philadelphia, v.203, n.4, p.399-402, 1986.
- LUNN, D.P., HOLMES, M.A., DUFFUS, W.P.H. Three monoclonal antibodies identifying antigens on all equine T lymphocytes, and two mutually exclusive T lymphocyte subsets. *Immunology*, Oxford, v.74, p.251-257, 1991.
- MACHADO, L.R. Líquido cefalorraqueano e neurocisticercose. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.45, n.4, p.353-363, 1987.
- MACHADO, L.R., NOBREGA, J.P.S., BARROS, N.G., LIVRAMENTO, J.A., BACHESCHI, L.A., SPINA-FRANÇA, A. Computed tomography in neurocysticercosis. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.48, n.4, p.414-418, 1990.
- MACKENZIE, M.R., WARNER, N.L., MITCHELL, G.F. The binding of murine immunoglobulins to staphylococcal protein A. *J. Immunol.*, Baltimore, v.120, n.5, p.1493-1496, 1978.
- MAHAJAN, R.C. Geographical distribution of human cysticercosis. In: FLISSER, A. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. New York: Academic Press, 1982. p.39-46.
- MALERGUE, F., CHUNGUE, E. Rapid and sensitive streptavidin-biotin amplified fluorogenic enzyme-linked immunosorbent-assay for direct detection and identification of dengue viral antigens in serum. *J. Med. Virol.*, New York, v.47, p.43-47, 1995.
- MALGOR, R., NONAKA, N., BASMADJIAN, I., SAKAI, H., CARÁMBULA, B., OKU, Y., CARMONA, C., KAMIYA, M. Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v.27, n.12, p.1605-1612, 1997.

- MANOUTCHARIAN, K., ROSAS, G., HERNANDEZ, M., FRAGOSO, G., ALUJA, A., VILLALOBOS, N., RODARTE, L.F., SCIUTTO, E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.82, n.2, p.250-254, 1996.
- McMICHAEL, A.J., FABRE, J.W. **Monoclonal antibodies in clinical medicine**. London: Academic Press, 1982. 663p.
- McCUNE, C.S., MARQUIS, D.M. Interleukin 1 as an adjuvant for active specific immunotherapy in a murine tumor model. *Cancer Res.*, Baltimore, v.50, p.1212-1215, 1990.
- MELEGOS, D.N., DIAMANDIS, E.P., ODA, H., URADE, Y., HAYAISHI, O. Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids. *Clin. Chem.*, Winston-Salen, v.42, n.12, p.1984-1991, 1996.
- MICHAULT, A., RIVIÈRE, B., FRESSY, P., LAPORTE, J.P., BERTIL, G., MIGNARD, C. Apport de l'enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay au diagnostic de la neurocysticercose humaine. *Pathol. Biol.*, Paris, v.38, n.2, p.119-125, 1990.
- MICHEL, P., MICHAULT, A., GRUEL, J.C., COULANGES, P. Le serodiagnostic de la cysticercose par ELISA et western blot. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, Madagascar, v.57, n.1, p.115-142, 1990.
- MINER, K.M., SKELLY, R.R., HAYES, E.C., GAMMON, M.T., MANYAK, C.L. Monoclonal antibodies: importance of the laboratory animal. In: MELBY Jr, E.C., BALK, M.W. **The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biomedical research**. London: Academic Press, 1983. Parte 6, p. 225-237.

MONTENEGRO, T., GILMAN, H.R., CASTILLO, R., TSANG, V., BRANDT, J., GUEVARA, A., SANABRIA, H., VERASTEGUI, M., STERLING, C., MIRANDA, E. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Hymenolepis nana*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v.36, n.4, p.327-334, 1994.

MONTENEGRO, T.C., MIRANDA, E.A. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.90, n.2, p.145-155, 1996.

NASCIMENTO, E., COSTA, J.O., GUIMARÃES, M.P., TAVARES, C.A.P. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Pathol.*, Amsterdam, v.45, p.127-137, 1995.

NASCIMENTO, E., TAVARES, C.A., LOPES, J.D. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.25, n.7, p.1181-1185, 1987.

NIBBELING, H.A.M., KAHAMA, A.I., VAN ZEYL, R.J.M.V., DEELDER, A.M. Use of monoclonal antibodies prepared against *Schistosoma mansoni* hatching fluid antigens for demonstration of *Schistosoma haematobium* circulating egg antigens in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.58, n.5, p.543-550, 1998.

NILSSON, B.O., SVALANDER, P.C., LARSSON, A. Immunization of mice and rabbits by intrasplenic deposition of nanogram quantities of protein attached to sepharose beads or nitrocellulose paper strips. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.99, p.67-75., 1987.

- NORGARD, M.V., SELAND, C.K., KETTMAN, J.R., MILLER, J.N. Sensitivity and specificity of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of *Treponema pallidum* Nichols in the diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.20, n.4, p.711-717, 1984.
- NUSSENZWEIG, R. Parasitic disease as a cause of immunosuppression. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.306, n.7, p.423-424, 1982.
- O'CONNOR, C.G., ASHMAN, L.K. Application of the nitrocellulose transfer technique and alkaline phosphatase conjugated anti-immunoglobulin for determination of the specificity of monoclonal antibodies to protein. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.54, p.267-271, 1982.
- OI, V.T., JONES, P.P., GODING, J.W., HERZENBERG, L.A., HERZENBERG, L.A. Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2, and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.81, p.115-129, 1978.
- OLDACH, D. W., GAYDOS, C. A., MUNDY, L. M., QUINN, T. C. Rapid diagnosis of *Chlamydia psittaci* pneumonia. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v.17, p.338-343, 1993.
- PAMMENTER, M.D., ROSSOUW, E.J., DINGLE, C.E. Serological detection of cysticercosis in two rural areas of South Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.81, p.242-244, 1987.
- PATHAK, K.M.L., GAUR, S.N.S. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.34, p.353-356, 1990.
- PARHAM, D.M., REYNOLDS, A.B., WEBBER, B.L. Use of monoclonal antibody 1H1, anticortactin, to distinguish normal and neoplastic smooth muscle cells: comparison with anti- α -smooth muscle actin and antimuscle-specific actin. *Hum Pathol*, Philadelphia, v.26, p.776-783, 1995.

- PARKHOUSE, R.M.E., HARRISON, L.J.S. Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes. *Parasite Immunol*, Oxford, v.9, p.263-268, 1987.
- PENG, Z., LI, H., SIMONS, F.E.R. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, St. Louis, v.101, n.4, p.498-505, 1998.
- PICKERING, J.W., GELDER, F.B. A human myeloma cell line that does not express immunoglobulin but yields a high frequency of antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol.*, Baltimore, v.129, n.1, p.406-412, 1982.
- PINTO, P.S.A. Diagnóstico imunológico da cisticercose suína como contribuição à inspeção de carnes. São Paulo, 1998. (Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública - USP).
- PIZZOLO, G., SLOANE, J., BEVERLEY, P., THOMAS, J.A., BRADSTOCK, K.F., MATTINGLY, S., JANOSSY, G. Differential diagnosis of malignant lymphoma and nonlymphoid tumors using monoclonal anti-leucocyte antibody. *Cancer*, Philadelphia, v.46, p.2640-2647, 1980.
- PLANCARTE, A., FEXAS, M., FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Inter. J. Parasitol.*, Oxford, v.24, n.5, p.733-738, 1994.
- POTTER, M., PUMPHREY, J.G., WALTERS, J.L. Growth of primary plasmacytomas in the mineral oil-conditioned peritoneal environment. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v.49, p.305-308, 1972.
- POTTER, M. Immunoglobulins and immunoglobulin genes. In: FOSTER, H. L., SMALL, J.D., FOX, J.G. **The mouse in biomedical research**. New York: Academic Press, 1983. cap.15, p.348-375.

- READING, C.L. Theory and methods for Immunization in culture and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.53, p.261-291, 1982.
- REIS, C.A., DAVID, L., NIELSEN, P.A., CLAUSEN, H., MIRGORODSKAYA, K., ROEPSTORFF, P., SOBRINHO-SIMÕES, M. Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* (pred. Oncol.), Copenhagen, v.74, p.112-121, 1997.
- RICHARDS, C.M., AUCKEN, H.A., TUCKER, E.M., HANNANT, D., MUMFORD, J.A., POWELL, J.R. The production of equine monoclonal immunoglobulins by horse-mouse heterohybridomas. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v.33, p.129-143, 1992.
- RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., CORREA, D., FLISSER, A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet. Record.*, London, v.124, p.488, 1989.
- RUSSELL, H., THARPE, J. A., WELLS, D. E., WHITE, E. H., JOHNSON, J. E. Monoclonal antibody recognizing a species-specific protein from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, n.10, p.2191-2195, 1990.
- SAHA, P.K., NAIR, G.B. Production of monoclonal antibodies to the non-membrane-damaging cytotoxin (NMDCY) purified from *Vibrio cholerae* O26 and distribution of NMDCY among strains of *Vibrio cholerae* and other enteric bacteria determined by monoclonal-polyclonal sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, Washington, v.65, n.2, p.801-805, 1997.

- SCHIJNS, V.E.C.J., CLAASSEN, I.J.T.M., VERMEULEN, A.A., HORZINEK, M.C., OSTERHAUS, A.D.M.E. Modulation of antiviral immune responses by exogenous cytokines: effects of tumour necrosis factor- α , interleukin-1, interleukin-2 and interferon- γ on the immunogenicity of an inactivated rabies vaccine. *J. Gen. Virol.*, London, v.75, p.55-63, 1994.
- SCHWABER, J., COHEN, E.P. Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature*, London, v.244, p.444-446, 1973.
- SECHER, D.S. Monoclonal antibodies by cell fusion. *Immunol. Today*, Barking, p.22-26, 1980.
- SEKEYOVÁ, Z., KOVÁCOVÁ, E., KAZÁR, J., TOMAN, R., OLVECKÁ, S. Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetti* that cross-react with strain nine mile. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.2, n.5, p.531-534, 1995.
- SMITH, M.A., CLEGG, J.A., SNARY, D., TREJDOSIEWICZ, A.J. Passive immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with an IgM monoclonal antibody. *Parasitology*, London, v.84, p.83-91, 1982.
- SOTELO, J., GUERRERO, V., RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v.145, p.442-445, 1985.
- SPINA-FRANCA, A. Cisticercose do sistema nervoso central: considerações sobre 50 casos. *Rev. Paul. Med.*, São Paulo, v.48, p.59-70, 1956.
- SPINA-FRANÇA, A. Patogenia das infecções do sistema nervoso central e líquido cefalorraquidiano: análise crítica da contribuição diagnóstica. *Rev. Paul. Med.*, São Paulo, v.107, n.3, p.169-174, 1989.
- SPINA-FRANÇA, A., LIVRAMENTO, J.A., MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.51, n.1, p.16-20, 1993.

- SPITZ, M. SPITZ, L., THORPE, R., EUGUI, E. Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.70, p.39-43, 1984.
- SPITZ, M. "Single-Shot" intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. *Methods. Enzymol.*, New York, v.121, p.33-41, 1986.
- STEERE, A.C., SIKAND, V.K., MEURICE, F., PARENTI, D.L., FIKRIG, E., SCHOEN, R.T., NOWAKOWSKI, J., SCHMID, C.H., LAUKAMP, S., BUSCARINO, C., KRAUSE, D.S. Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein a with adjuvant. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v.339, n.4, p.209-215, 1998.
- STITES, D.P. **Basic and clinical immunology**. 8.ed. London: Prentice-Hall International, 1994. p.189-190. (Lange Medical Book).
- TAKAYANAGUI, O.M., JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose: análise de 500 casos. *Arq. Neuro-psiquiatria*, São Paulo, v.41, n.1, p.50-63, 1983.
- TAN, L., GREGORIADIS, G. Effect of interleukin-2 on the immunoadjuvant action of liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, London, v.17, p.693-694, 1988.
- TELLEZ-GIRON, E., RAMOS, M.C., ALVAREZ, P., DUFOUR, L., MONTANTE, M. Detection and characterization of antigens from *Taenia solium* cysticercus in cerebrospinal fluid. *Acta Leidensia*, Leiden, v.57, n.2, p.101-105, 1989.
- THOELEN, S., VAN DAMME, P., MATHEI, C., LEROUX-ROELS, G., DESOMBERE, I., SAFARY, A., VANDEPAPELIERE, P., SLAOUI, M., MEHEUS, A. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine.*, Guildford, v.16, n.7, p.708-714, 1998.

- TOWBIN, H., GORDON, J. Immunoblotting and dot immunoblotting - current status and outlook. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.72, p.313-340, 1984.
- TSAI, C., FRASCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, Washington, v.119, p.115-119, 1982.
- TSANG, V.C.W., BRAND, J.A., BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.159, n.1, p.50-59, 1989.
- TSANG, V.C.W., LPILCHER, J.A., ZHOU, W., BOYER, A.E., KAMANGO-SOLLO, E.I.P., RHOADS, M.L., MURRELL, K.D., SCHANTZ, P.M., GILMAN, R.H. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, Amsterdam, v.29, p.69-78, 1991.
- VALDEZ, F., HERNÁNDEZ, M., GOVEZENSKY, T., FRAGOSO, G., SCIUTTO, E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.80, n.6, p. 931-936, 1994.
- VALESCO-CASTREJÓN, O., GUTIÉRREZ-QUIROZ, M., ROMERO, V., GUZMÁN-BRANCHO, C. Detección de antígenos solubles de *Cysticercus cellulosae* en líquido cefalorraquídeo como medio diagnóstico en neurocisticercosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, México City, v.31, p.235-239, 1989.

- VAZ, A.J. *Cysticercus longicollis*: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano na neurocisticercose humana. São Paulo, 1993. (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
- VAZ, A.J., NAKAMURA, P.M., BARRETO, C.C., FERREIRA, A.W., LIVRAMENTO, J.A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. *Serodiagn. Immunoeth. Infec. Dis.*, v.8, p.157-161, 1997(a).
- VAZ, A.J., NUNES, C.M., PIAZZA, R.M.F., LIVRAMENTO, J.A., SILVA, M.V., NAKAMURA, P.M., FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.57, n.3, p.354-357, 1997(b).
- VIEIRA, J. G. H., NISHIDA, S. K., LOMBARDI, M. T., ABUCHAM, J. Z., KASAMATSU, T. S. Monoclonal antibodies specific for the free alpha subunit of glycoprotein hormones and their use in the development of a sensitive immunofluorometric assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, São Paulo, V.28, P.633-636, 1995.
- WELLS, D. E., PRICE, P.J. Simple rapid methods for freezing hybridomas in 96-well microculture plates. *J. Immunol. Methods.*, Amsterdam, v.59, p.49-52, 1983.
- WETZLER, L.M., BLAKE, M.S., GOTSCHLICH, E.C. Characterization and specificity of antibodies to protein I of *Neisseria gonorrhoeae* produced by injection with various protein I-adjuvant preparations. *J. Exp. Med.*, New Yourk, v.168, p.1883-1897, 1988.

- WOJCIESZYN, J.W., SCHLEGEL, R.A., LUMLEY-SAPANSKI, K., JACOBSON, K.A. Studies on the mechanism of polyethylene glycol-mediated cell fusion using fluorescent membrane and cytoplasmic probes. *J. Cell. Biol.*, New York, v.96, p.151-159, 1983.
- WU, H., RUSSELL, M.W. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine*, Guildford, v.16, n.2/3, p.286-292, 1998.
- ZARLENGA, D.S., RHOADS, M.L., AL-YAMAN, F.M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.67, p.215-223, 1994.
- ZWAS, S.T., GOSHEN, E., RATH, P., BRENNER, H., KLEIN, E., BEN-ARI, G. Detection efficiency of colorectal carcinoma recurrence using technetium pertechnetate-anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody BW 431/26. *Cancer*, Philadelphia, v.76, p.215-222, 1995.
- YAMAMOTO, M., BLACK, J.B., STEWART, J.A., LOPEZ, C., PELLETT, P.E. Identification of a nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infection. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.28, p.1957-1962, 1990.
- YAMANAKA, M., HIRAMATSU, K., HIRAHARA, T., OKABE, T., NAKAI, M., SASAKI, N., GOTO, N. Pathological studies on local tissue reactions in guinea pigs and rats caused by four different adjuvants. *J. Vet. Med._Sci.*, Tokyo, v.54, n.4, p.685-692, 1992.
- YANG, H.J., CHUNG, J.Y., YUN, D.H., KONG, Y., ITO, A., MA, L., LIU, Y.H., LEE, S.C., KANG, S.Y., CHO, S.Y. Immunoblot analysis of 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.20, p.483-488, 1998.

ANEXOS

1 - ABREVIATURAS

ACF: adjuvante completo de Freund

AIF: adjuvante incompleto de Freund

BCIP: 5 bromo-4 cloro-3 indol-fosfato

Blot: "immunoblotting"

BS-I: *Bandeiraea simplicifolia*

ConA: concanavalina

DAB: 3, 3'diaminobenzidina

DMF: N, N dimetil-formamida

DMSO: dimetil sulfoxido

D.O.: densidade óptica

EDTA: sal dissódico dihidratado do ácido etilenodiaminotetracético

ELISA: "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY"

E-Tso: antígeno de escólex de *Taenia solium*

EV: intravenosa

GI: animais inoculados com 200µl de salina (controle)

GII: animais imunizados com 20µg de LV-Tcra

GIII: animais imunizados com 50µg de LV-Tcra

GIV: animais imunizados com gel<30 kD (~50µg)-Tcra

GV: animais imunizados com 50µg de LV-Tcra, coleta a partir do 5º dia

GVI: animais imunizados com 50µg antígeno eluato <30kD-Tcra

GVII: animais imunizados com 50µg antígeno T-Tso

HAT: hipoxantina, aminopterina e timidina

HT: hipoxantina e timidina

Ig: imunoglobulina total

IgA: imunoglobulina do isotipo A

IgG: imunoglobulina do isotipo G

IgM: imunoglobulina do isotipo M

IP: intraperitoneal

LCR: líquido cefalorraquiano

LV-Tcra: antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps*

NBT: nitroblue tetrazolium

NC: neurocisticercose

OPD: o-fenilenodiamina

P: "pool"

PEG: polietilenoglicol

SC: subcutânea

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

SFB: soro fetal bovino

Tcra: *Taenia crassiceps*

TMB: tetrametilbenzidina

Tso: *Taenia solium*

T-Tso: antígeno total de *Taenia solium*

2 - SOLUÇÕES UTILIZADAS

PBS-I: Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,0025M e NaCl 0,14M - pH7,2

PBS-II: Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,0025M e NaCl 0,14M - pH7,4

SALINA: NaCl 0,15M

Tampão carbonato/bicarbonato: Na_2CO_3 0,003M e NaHCO_3 0,007M - pH9,6

Tampão citrato/fosfato: ácido cítrico 0,01M e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M - pH5,0

Tampão de corrida: Tris-hidroximetilaminoetano 0,075M, glicina 0,576M e SDS 0,15M - pH8,3

Tampão de transferência: Tris-hidrometilaminoetano 25mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v) - pH8,3

T/S (Tris/salina) : Tris 10mM e NaCl 0,9% - pH7,5