BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana

Noeli Maria Espíndola

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador
Profa. Dra. Adelaide José Vaz**

**Co-orientador
Dra. Irene Fernandes**

**São Paulo
2004**

17851

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005877

Ficha Catalográfica

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

Espíndola, Noeli Maria
E77c Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação
para o diagnóstico da cisticercose humana / Noeli Maria
Espíndola. -- São Paulo, 2003.
95p.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Vaz, Adelaide José
Co-orientador: Fernandes, Irene

I. Cisticercose : Infecção 2. Antígeno : Imunologia I.
T. II. Vaz, Adelaide José, orientador, III. Fernandes, Irene,
co-orientador..

616.964 CDD

Noeli Maria Espíndola

Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana

**Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor**

**Profa. Dra. Adelaide José Vaz
orientador/presidente**

**Dra. Harumi Ando Takehara
1º. examinador**

**Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado
2º. examinador**

**Prof. Dr. José Antônio Livramento
3º. examinador**

**Dra. Irene Fernandes
4º. examinador**

São Paulo, 23 de janeiro de 2004.

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

ABREVIACÕES

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

INTRODUÇÃO

1

OBJETIVO

16

MATERIAL E MÉTODOS

1 – Parasitas e Extratos Antigênicos

17

2 – Obtenção de Antígenos de Excreção e Secreção (ES) de Tcra

17

3 – Amostras de Soros e LCR

19

4 – Caracterização dos Antígenos de Tcra, Tso e Tsag

19

5 – Obtenção dos AcMo

22

6 – Determinação da Afinidade do AcMo anti-ES-Tcra

28

7 – Reatividade dos AcMo

29

8 – Especificidade dos AcMo frente a Antígenos de Cisticercos

30

9 – Utilização dos AcMo

30

10 – Obtenção dos Antígenos de Tcra e Tso Necessários ao Sequenciamento

37

RESULTADOS

1 – Extratos Antigênicos

38

2 – Obtenção de Antígenos de Excreção e Secreção de Tcra (ES-Tcra)

40

3 – Produção e Especificidade de Anticorpos IgG em BALB/c

43

4 – Obtenção dos AcMo

44

5 - Expansão dos AcMo por Indução de Líquido Ascítico em Camundongos

46

6 - Determinação da Constante de Afinidade do AcMo Anti-ES-Tcra

47

7 - Especificidade de AcMo frente a Antígenos de Tcra, Tso e Tsag

49

8 - Utilização dos AcMo

50

8.1 - Purificação de Antígeno LV-Tcra com AcMo Anti-Tcra

50

8.2 - Pesquisa de Anticorpos por ELISA Competição em LCR de Pacientes com NC Utilizando Antígenos de Tcra E Tso

55

8.3 – Avaliação Imunoquímica do Antígeno LV-Tcra Utilizando AcMo

57

8.4 - Pesquisa de Antígeno em LCR de Pacientes com NC por ELISA e imunoblot Utilizando AcMo anti-Tcra

60

9 - Sequenciamento dos Antígenos de Tcra e Tso

62

DISCUSSÃO

64

CONCLUSÕES

79

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

80

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

**Este trabalho foi realizado no laboratório de Imunologia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e laboratório de
Imunopatologia do Instituto Butantan**

**Apoio Financeiro: FAPESP, processos 00/0140-7 e
00/0141-3**

Fonte de Inspiração

Uma grande mulher

És tu Adelaide José Vaz uma grande mulher por...
Saber que Deus é a essência de tudo;
Acreditar e mostrar que é preciso amar as pessoas e a Ciência;
Ter braços fortes o suficiente para segurar tantos filhos;
Ter tanta fibra e coragem;
Ser um exemplo de ética e capacidade profissional.

Um grande homem

És tu José Juvenal Espíndola um grande homem por...
Ter Deus em seu coração;
Exercer sua simples profissão de pescador com muito amor;
Não importar se “a maré está boa para peixe”, mas sempre estar de
bem com a vida;
Ter me ensinado a ser digna e respeitar as pessoas.

Um pequeno cientista

Considero você José Victor Espíndola um jovem cientista por...
Já aos seus 8 anos ter descoberto que só os livros tem a explicação
para tudo que existe na natureza, inclusive que o DNA é essencial para a
síntese da vida;
Amar os livros e tratá-los como suas jóias preciosas;
Considerar o livro o melhor presente que existe;
Ser a esperança de um Brasil melhor.

....Quero me espelhar nestas pessoas para ser um pequeno ser com
dignidade a vida.

**Agradeço ao Senhor Nosso Deus
Por ter me presenteado com a vida, inteligência, capacidade de amar
as pessoas e a Ciência..... obrigado meu DEUS.**

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Aos meus queridos pais

José Juvenal Espíndola e Maria Alzerina Espíndola

Por todo apoio e palavras de conforto durante minha caminhada.

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 Victor,

Leonardo, Tiago e Kamila, e meu afilhado Ricardo pela alegria

compartilhada durante este período.

A minha companheira de luta Alessandra Xavier Pardini

Pelas palavras de conforto nas horas certas, pelo socorro nos

momentos mais difíceis e pelos sorrisos divididos.

À minha segunda família

Por tudo que me fizeram durante minha permanência em São Paulo;

ao senhor Euclides e família meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Associada Adelaide José Vaz, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela sua disponibilidade, dedicação e palavras amigas e de conforto durante minha orientação nos cursos de pós-Graduação.

A Dr.^a Irene Fernandes, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan pelos conhecimentos transmitidos, dedicação e palavras amigas e de conforto.

A Prof.^a Dr.^a Irene da Silva Soares, da Disciplina de Parasitologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Prof. Associado José Antônio Livramento, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas críticas e sugestões no Exame de Qualificação.

A Prof.^a Dr.^a Kioko Takei, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela sua paciência em passar seus conhecimentos e pelo incentivo.

A Prof.^a Titular Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Chefe do Departamento de Farmácia Análises Clínicas da USP e Dr.^a Harumi Ando Takehara, responsável pelo Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, por terem permitido realizar o desenvolvimento experimental nas Instituições.

Ao pesquisador Paulo Mutuko Nakamura, do setor de Sorologia do Instituto Adolfo Lutz pelo incentivo e apoio.

A Jaime Salvatierra Oporto, Orestes Martim Corrêa Rosado e Rodinei Carvalho de Oliveira, médicos veterinário do Ministério de Agricultura de Santa Catarina, pelo incentivo as minhas conquistas durante o curso de Pós-Graduação.

A Isabele do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, pela paciência em passar seus conhecimentos no início dos experimentos e palavras amigas.

Ao aluno de iniciação científica, Alberto, pela grande ajuda nos experimentos e discussão do trabalho.

A equipe Cisticercóticos (Alberto, Alê, Cris, Déia, Ednéia, Elói, Fernando, Márcia e Paula), Edward, Sandra e Silene pela ajuda e companherismo do dia a dia no Laboratório de Imunologia da USP.

Aos demais AMIGOS que compartilharam os bons momentos, e juntos contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Larvas de *Taenia crassiceps* foram cultivadas *in vitro* por 144 h e deram origem a dois "pools" de antígenos de secreção e excreção (ES) nas 24 h (ES24) e 48 h (ES48), caracterizados como frações <30 kDa, que foram utilizados para a detecção de anticorpos em amostras de pacientes com neurocisticercose (NC) e em soro imune de coelho imunizados com antígenos de *Taenia crassiceps* (Tcra) e *Taenia solium* (Tso) com reatividade para os peptídeos 30-, 18- e 14-12- kDa. O ES48, pela sua maior reatividade com anticorpos anti-Tso, e os antígenos líquido vesicular de Tcra (LV-Tcra), líquido vesicular (LV-Tso), total (T-Tso) e de escólex (E-Tso) de Tso foram utilizados na produção de anticorpos monoclonais (AcMo). Os anticorpos monoclonais obtidos foram utilizados nos estudos de caracterização dos antígenos de Tcra e Tso, na pesquisa de anticorpos e antígenos em amostras de pacientes com NC.

De um total de 24 clones obtidos, um anti-ES-Tcra, um anti-LV-Tcra, 3 anti-LV-Tso e 4 anti-T-Tso reconheceram os peptídeos 18- e 14-12- kDa de Tcra e 14-12- kDa de Tso, os 3 anti-E-Tso reagiram apenas com peptídeos >45 kDa de Tso e os demais 5 anti-T-Tso e 7 anti-LV-Tso reconheceram apenas o 14-12 kDa de Tso, não mostrando reatividade cruzada com Tcra.

O estudo imunoquímico do antígeno LV-Tcra tratado por aquecimento, com NaBH₄, TCA e ácido periódico por ELISA e imunoblot utilizando os AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, um anti-LV-Tso e um anti-T-Tso, mostrou que houve redução na reatividade após o tratamento com TCA e ácido periódico, o que não ocorreu após o tratamento por aquecimento e NaBH₄.

Frações <20 kDa de Tcra foram purificadas com AcMo anti-Tcra e utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-Tso em amostras de pacientes com NC. Os AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, um anti-LV-Tso e um anti-T-Tso, todos com reatividade para Tcra e Tso foram utilizados na pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com NC por ELISA competitivo utilizando antígeno de Tcra e Tso. Os AcMo anti-Tcra foram muito

úteis na pesquisa de antígeno em LCR de pacientes com NC, com reatividade para peptídeos 30-, 18- e 14-12- kDa.

SUMMARY

Taenia crassiceps cysticerci were kept in vitro during 144 h. Excretory/Secretory (ES) antigens (peptides <30 kDa) were identified in 24 (ES24) and 48 h (ES48). ES peptides 30-, 18- and 14-12- kDa were recognized by polyclonal antibodies produced in rabbits immunized with *Taenia crassiceps* (Tcra) and *Taenia solium* (Tso) antigens, and antibodies in samples of serum and cerebrospinal fluid (CSF) from patients with neurocysticercosis (NC).

Monoclonal antibodies (MoAb) were prepared against ES-Tcra, Tcra vesicular fluid (VF-Tcra), Tso vesicular fluid (VF-Tso), Tso total (T-Tso) and Tso scolex (E-Tso) antigens. The MoAb were utilized in characterization of Tcra and Tso antigens, and in the antigens detection in samples of patients with NC.

Twenty four MoAb were obtained, from which nine (1 anti-ES-Tcra, 1 anti-VF-Tcra, 3 anti-VF-Tso and 4 anti-T-Tso) reacted with peptides 18- and 14-12- kDa in Tcra antigens, and peptide 14-12 kDa in Tso antigens.

The MoAb maintained their reactivity towards VF-Tcra antigen treated with heat and alkaline borohydride and showed reduction after trichloroacetic acid and periodate oxidation treatments.

Peptides <20 kDa in VF-Tcra antigen were purified by anti-Tcra MoAb and were used to detect antibodies in serum and CSF taken from patients with NC. Anti-Tcra and anti-Tso MoAb with reactivity for Tcra and Tso antigens were used to detect antibodies, and anti-Tcra MoAb to detect antigens in serum and CSF from patients with NC.

ABREVIações

Tcra: *Taenia crassiceps*

ES-Tcra: antígenos de excreção e secreção de Tcra

Tso: *Taenia solium*

Tsag: *Taenia saginata*

LV-Tcra: antígeno líquido vesicular de Tcra

LV-Tso: antígeno líquido vesicular de Tso

T-Tso: antígeno total de Tso

E-Tso: antígeno de escólex de Tso

M-Tso: antígeno de membrana de Tso

T-Tsag: antígeno total de Tsag

EM-Tsag: antígeno de escólex e membrana de Tsag

SNC: sistema nervoso central

NC: neurocisticercose

LCR: líquido cefalorraquiano

AcMo: anticorpos monoclonais

gp: glicoproteínas

PFHM: protein-free hybridoma medium

ES24: "pool" ES coletado 24 h após cultivo das larvas de Tcra

ES48: "pool" ES coletado 48 h após cultivo das larvas de Tcra

ES96: "pool" ES coletado 96 h após cultivo das larvas de Tcra

ES144: "pool" ES coletado 144 h após cultivo das larvas de Tcra

T0, T8, T12, T19, T29, T31 e T44: soros de camundongos coletados antes da imunização e no 8°, 12°, 19°, 29°, 31° e 44° dias, respectivamente, após imunização.

ACF: adjuvante completo de Freund

AIF: adjuvante incompleto de Freund

ELISA: "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY"

A_{max} : absorvância máxima

$A_{50\%}$: absorvância que corresponde a 50% de inibição da ligação do AcMo ao antígeno.

n: número de moles de antígeno necessário para a absorvância 50%

PBS: tampão fosfato salina (Na_2HPO_4 0,0075 M, NaH_2PO_4 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2)

PBS-T: PBS contendo 0,05% de Tween 20

NBT/BCIP: nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato

T/S: Tris-hydroxymethylaminoethane 0,01 M e NaCl 0,15 M, pH 7,4

OPD: orto-fenilenodiamina

SFB: soro fetal bovino

DMSO: dimetilsulfóxido

HAT: hipoxantina, aminopterina e timidina

HT: hipoxantina e timidina

RPMI: RPMI 1640 suplementado com L-glutamina a 1%, piruvato de sódio a 2%, MEM não essenciais 1%, gentamicina 0,1% e HEPES 1,5%.

RPMI*: RPMI enriquecido com soro fetal bovino 10%

TMB: 3, 3', 5, 6' – tetrametilbenzidine

Tampão glicina/HCl: glicina 0,2 M e cloreto de sódio 0,15 M, pH 2,8

Tampão borato: ácido bórico 0,1 M, tetraborato de sódio 0,1 M e cloreto de sódio 1 M, pH 8,5.

Tampão borato-salina: tampão borato diluído 1:20 em NaCl 0,15 M

TCA: ácido tricloroacético

Tampão de acloperamento: NaHCO_3 1,0 M e NaCl 0,5 M, pH 8,3

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Quantidade total de proteínas obtidos dos extratos antigênicos de Tcra, Tso e Tsag.

Tabela 2: Quantidade de larvas em cultura e quantidade total de proteínas liberadas por larva durante o cultivo das larvas em meio de cultura, e dos controles.

Tabela 3: Anticorpos monoclonais anti-LV-Tcra, anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso obtidos, suas reatividades por ELISA com os respectivos antígenos e a especificidade por imunoblot utilizando antígeno Tcra e Tso.

Tabela 4: Cncentração do AcMo anti-ES-Tcra com 50% de inibição, das DO do ELISA (com 0,02 µg/mL de AcMo e com 50% da absorbância máxima) e o PM da fração de LV-Tcra.

Tabela 5. Códigos (letras) correspondentes a cada mistura de AcMo anti-ES-Tcra (ES), anti-LV-Tso (A3), anti-T-Tso (B11) e anti-E-Tso (B8) juntamente com LCR utilizados no ELISA competição.

Tabela 6. ELISA utilizando LCR de pacientes com NC e controle negativo utilizando AcMo anti-ES-Tcra.

Tabela 7. Resultados dos sequenciamentos dos peptídeos 18 e 14-12 kDa de LV-Tcra nativo, 14-12 kDa de Tcra e 18 e 14-12 kDa de Tso purificados, e de Tcra e Tso seqüenciados por outros autores.

Figura 1: Perfil eletroforético dos antígenos obtidos de Tcra, Tso e Tsag corados pelo nitrato de prata.

Figura 2: SDS-PAGE dos "pools" ES obtidos durante o cultivo das larvas de Tcra em meio de cultura e dos controles, corados pelo nitrato de prata.

Figura 3: Imunoblot utilizando antígenos ES24, ES48 e controle C-LV frente aos anticorpos policlonais dos soros de coelho anti-LV-Tcra e anti-Tso, e de soro e LCR de 5 pacientes com NC.

Figura 4: Resultados do ELISA com AcMo anti-ES-Tcra em diferentes concentrações, frente ao antígeno LV-Tcra.

Figura 5: Resultados da média das DO do ELISA utilizando sobrenadante da mistura entre o AcMo anti-ES-Tcra na concentração 0,02 µg/mL e antígeno LV-Tcra em diferentes concentrações.

Figura 6: Peptídeos de Tcra, Tso e Tsag reconhecidos por AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra.

Figura 7: Resultado do SDS-PAGE corado pelo Coomassie blue do antígeno LV-Tcra antes e após a purificação com AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra.

Figura 8: Imunoblot de antígenos de Tcra e Tso juntamente com AcMo anti-Tcra e anti-Tso.

Figura 9: Imunoblot utilizando soros negativo e positivo e LCR negativo e positivo de pacientes com NC, e antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra.

Figura 10: Resultado do dot-ELISA utilizando LCR negativo e positivo e soros negativo e positivo de pacientes com NC, com antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra.

Figura 11: Resultados do ELISA competição de AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso e anti-T-Tso com anticorpo presente em LCR de pacientes com NC pelos dos antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

Figura 12: Resultados da competição de AcMo anti-Tcra e anti-Tso em diferentes misturas com anticorpo presente em LCR de pacientes com NC pelos dos antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

Figura 13: Resultados do ELISA utilizando AcMo anti-Tcra e anti-Tso e antígeno LV-Tcra sem tratamento, com aquecimento (100°C, 15 min), tratado com NaBH₄, TCA e ácido periódico (H₅IO₆).

Figura 14: Imunoblot com antígeno LV-Tcra sem ou com tratamento por NaBH₄, TCA e ácido periódico pelos AcMo (A) anti-ES-Tcra, (B) anti-LV-Tcra, (C) anti-LV-Tso e (D) anti-T-Tso.

Figura 15: Imunoblot com antígenos de cisticercos em amostras de LCR de pacientes com NC utilizando AcMo anti-ES-Tcra.

Figura 16: Imunoblot com antígenos de cisticercos em amostras de LCR de pacientes com NC utilizando AcMo anti-LV-Tcra.

INTRODUÇÃO

ASPECTOS GERAIS

A cisticercose é uma infecção que pode acometer tanto suíno como o homem, e é causada pela forma larvária de *T. solium* (Tso) após a ingestão de ovos viáveis. A forma larvária tem tendência a se instalar no globo ocular, conjuntivo interfascicular do músculo estriado, tela subcutânea, leptomeninges e no sistema nervoso central (SNC). A neurocisticercose (NC) humana é a forma mais grave da doença, pela localização da larva no SNC, sendo considerada um grave problema de Saúde Pública (SPINA-FRANÇA, 1984).

O homem é o hospedeiro definitivo do verme adulto, e elimina ovos embrionados pelas fezes, que são infectantes no meio ambiente. O suíno, após ingestão dos ovos, pode desenvolver cisticercose, 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.

Quando a forma larvária se localiza no SNC, pode desenvolver manifestações clínicas de diferentes formas que dependerá de um conjunto de fatores, incluindo resposta imune do hospedeiro, topografia da lesão, localização das larvas, quantidade de cistos e tipos de seqüelas desenvolvidas no homem (SOTELO et al., 1985). Esse pleomorfismo da doença torna difícil o diagnóstico clínico e a utilização de terapia adequada ao quadro.

A dificuldade de se estabelecer um tratamento adequado e a gravidade da doença, torna necessário adotar medidas profiláticas de modo a prevenir a patologia. No entanto, esses procedimentos encontram-se aquém do mínimo necessário em diferentes regiões do terceiro mundo, motivo pelo qual a incidência ainda continua alta (SPINA-FRANÇA et al., 1993). A presença de suínos infectados e condições sanitárias insuficientes, caracterizadas por falta ou deficiência de fiscalização sanitária das carnes de consumo e hábitos de higiene insatisfatórios, são fatores relevantes na transmissão da cisticercose humana (SPINA-FRANÇA, 1956). 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).

O complexo teníase-cisticercose poderia ser controlado com o tratamento do portador do verme adulto, fiscalização das criações de suínos, condições sanitárias que impeçam a contaminação fecal de água e alimentos, bem como o diagnóstico. Se todas essas medidas fossem tomadas, a cisticercose poderia ser perfeitamente evitada.

A NC pode se manifestar de diferentes formas, variando de pessoa para pessoa, sugerindo tratamento individualizado. As metas da terapia incluem identificar o cisto, tratar as complicações provocadas pelo parasita, prevenir sequelas e minimizar tempo prolongado de tratamento, bem como os efeitos colaterais dos medicamentos. Existem cinco modalidades de tratamentos: quimioterápicos que leva a morte do parasita, corticosteróides ou outros agentes imunossupressores para reduzir o processo inflamatório, remoção cirúrgica do cisto, medicamentos para prevenir a severidade e números de convulsões e medidas de suporte geral para pacientes com sintomas provocados ou não pelo tratamento (NASH, 2003).

Apesar das dificuldades de ordem biológica, estatística e técnica, inerentes à investigação epidemiológica da cisticercose, diversos relatos de casos direcionam a concluir que a cisticercose humana tem distribuição universal, sendo freqüente no México, Ásia, África, América do Sul (MACHADO

et al., 1988). A infecção também preocupa autoridades sanitárias de países industrializados que recebem imigrantes de áreas endêmicas.

No Brasil, os estudos da cisticercose humana estão restritos a Centros de Especialização Neurológica, e apontam para a frequência da NC, que varia de 1,6% a 7,5% dos pacientes internados com distúrbios neurológicos, tendo como causa a presença de cisticercos no SNC (TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983; SPINA-FRANÇA et al., 1993). O alto custo dos atendimentos e elevadas taxas de letalidade e morbidade dos pacientes diagnosticados com NC são preocupantes (SCIUTTO et al., 1995).

A dificuldade de disponibilizar reagentes diagnósticos com elevadas sensibilidade e especificidade colabora para a escassez de dados que permitam, além do conhecimento da situação real da parasitose em nosso meio, o direcionamento adequado de políticas de saúde regionalizadas com a finalidade de erradicação desse agravo à saúde e qualidade de vida.

A NC é uma doença crônica, com surtos de agudização, quadro meningítico, convulsões epileptiformes, podendo levar à demência mental global progressiva, hipertensão intracraniana, vasculites e até quadros de edema cerebrais, muitas vezes fatais ao paciente (SOTELO et al., 1985). Dessa forma, a sintomatologia pode ser muito variada de modo a sugerir diagnósticos neurológicos e psiquiátricos diversos, e métodos laboratoriais de diagnóstico são requeridos para determinar a etiologia do processo.

O cisto pode evoluir em três fases no líquido cefalorraquiano (LCR), a primeira se caracteriza pela presença do cisto viável no SNC, e o LCR pode se apresentar com composição normal. Na segunda fase, o cisto se encontra em estado de degeneração, e o LCR é caracterizado como "síndrome do LCR da NC" (SPINA-FRANÇA, 1961). Na síndrome do LCR, geralmente são detectados anticorpos anti-Tso, eosinoflorraquia, aumento de proteínas, principalmente de gama-globulinas, que é marcado pelo aumento de IgG (LIVRAMENTO et al., 1993). É nesta fase que geralmente ocorre hipertensão craniana, epilepsia, vasculites e obstrução da circulação do LCR (SOTELO et al., 1985). A

exacerbação pode ocorrer quando há um novo episódio de estimulação neuroimune, e geralmente é breve e está relacionada a hipercitose (eosinófilos são os mais encontrados), que até pode ser consequência do uso de drogas contra o parasita (SPINA-FRANÇA & REZENDE, 1982). Já na terceira fase, os cistos se tornam fibróticos, com desenvolvimento de granulomas e calcificações (SOTELO et al., 1985). As diferenças entre as fases do cisto geralmente dependem da sua adaptação em estruturas circunvizinhas (SPINA-FRANÇA, 1984).

De modo geral, enquanto o parasita está vivo, observa-se pouca ou nenhuma resposta inflamatória reacional, mas a liberação de catabólitos ocorre durante todo o processo infeccioso. Após a morte e degeneração do parasita observa-se liberação maciça dos antígenos, exacerbação do processo imune-inflamatório, grande quantidade de anticorpos formando imunocomplexos e suas conseqüentes atividades biológicas. Nessa fase, os exames de imagem e do LCR mostram a intensa atividade inflamatória local e elucidam o diagnóstico. A detecção de anticorpos específicos anti-cisticercos no LCR confirma a etiologia do quadro apresentado.

DIAGNÓSTICO

Embora muitos dados estejam disponíveis referentes a cisticercose, ainda muitas questões permanecem obscuras. Apesar disso, é possível reunir vários dados clínicos que, em conjunto com os exames do LCR e de imagem, classificam a doença como uma das mais sérias afecções do SNC (SPINA-FRANÇA, 1984).

A confirmação da doença é difícil, principalmente pelo fato dos sintomas serem comuns a outras patologias, incluindo tumor cerebral, acidente vascular cerebral e epilepsia idiopática (MONTENEGRO et al., 1994).

O diagnóstico da NC é feito pela clínica do paciente juntamente com o exame de imagem (tomografia e ressonância magnética) e análise do LCR.

Estes exames servem também para auxiliar no acompanhamento da evolução da NC (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).

O alto custo dos exames de imagem inviabiliza sua aplicação em centros de saúde, principalmente nas regiões de baixa condição econômica, que correspondem aos focos da doença. Nesse caso, a análise laboratorial do LCR seria mais apropriada, pelo fato de também ser um exame especializado, com a vantagem de ser menos dispendioso.

Este fato estimulou pesquisadores a padronizar ensaios para melhor esclarecer e diagnosticar a cisticercose. No Brasil, o primeiro teste para pesquisa de anticorpo em paciente com NC foi descrito em 1911, por reação de fixação de complemento, utilizando antígeno preparado de Tso (MOSES, 1911). Hoje se sabe que mundialmente já foram padronizados vários tipos de ensaios com frações antigênicas de Tso para pesquisa de anticorpos, tais como reação de fixação de complemento (NIETO, 1956), imunoelektroforese (FLISSER et al., 1979), imunofluorescência (FLISSER et al., 1980; LIVRAMENTO, 1981), hemaglutinação indireta (NASCIMENTO & WAVRINK, 1984), ELISA (GOTTSTEIN et al., 1986; PLANCARTE et al., 1994), dot-ELISA (TELLEZ-GIRON et al., 1987; PLANCARTE et al., 1994), imunoblot (TSANG et al., 1989; VAZ et al., 1997 b).

Existem imunoensaios com excelente eficiência diagnóstica na pesquisa de anticorpo em LCR de pacientes com NC (VAZ et al., 1997 b). No entanto, a sensibilidade e especificidade de outros ensaios existentes para pesquisa de anticorpos em amostras de soro variam muito de um teste para outro. A baixa qualidade de alguns imunoensaios muitas vezes é justificada por estes não possuírem antígenos específicos do parasita em estudo (NASCIMENTO et al., 1987), e a obtenção de antígenos purificados pode auxiliar no desenvolvimento de métodos mais específicos para cisticercose.

A utilização de antígeno de Tso purificado por focalização isoelétrica (PAMMENTER & ROSSOUW, 1987) e de glicoproteínas obtidas por imunoafinidade com lectinas (TSANG et al., 1989; RESTREPO et al., 2000) têm-se mostrado mais eficiente que os com antígenos brutos na pesquisa de anticorpos. No entanto os métodos de purificação utilizados são considerados trabalhosos e de baixo rendimento (RESTREPO et al., 2000).

Uma limitação para a execução de ensaios na NC é a obtenção de amostras de pacientes. O LCR é o material de escolha para o diagnóstico da NC, e sua coleta exige pessoa qualificada e condições adequadas à punção, sendo considerado método invasivo. Os estudos utilizando soro como amostra ainda mostram reações inespecíficas e cruzadas com outras parasitoses (GOTTSTEIN et al., 1986; MONTENEGRO et al., 1994). Para ajudar a solucionar este tipo de problema, métodos de purificação de peptídeos de Tso específicos têm sido propostos, no entanto há dificuldades de obtenção de antígenos de cisticercos de Tso em quantidade suficiente para essa abordagem.

Nem sempre a deficiência do teste é que leva a um diagnóstico incompatível com a verdadeira clínica do paciente, muitas vezes a fase que se encontra o parasita no hospedeiro pode levar a falsas conclusões. Dependendo da fase da doença, podem ser detectados ou não anticorpos na amostra de escolha. E até onde se sabe, as técnicas para detectar anticorpos não diferenciam infecção recente com cistos viáveis das com cistos em degeneração ou até calcificados (DRAELANTS et al., 1995b; CHANG-YUAN et al., 1992). Pode haver situações em que a detecção de anticorpos seja negativa na fase inicial da doença, ou ainda, a presença de anticorpos pode indicar apenas exposição ao parasita, e não necessariamente a infecção, e inclusive o título de anticorpo pode persistir por muito tempo após a eliminação do parasita (HARRISON et al., 1989, GARCIA et al., 1997).

Uma alternativa para esses casos seria a pesquisa de antígeno na amostra coletada. A detecção de antígeno pode ser um forte indício que o

parasita ainda está vivo e/ou em estado de degeneração no hospedeiro. Detectar o parasita no início da infecção, e diferenciar as fases da doença, ajudaria muito o paciente no tratamento, principalmente se a detecção for feita antes do cisto se instalar em regiões críticas do SNC, uma vez que a larva, quando viável, pode ser morta pela droga de escolha. Caso o parasita já tenha se instalado em uma região crítica no SNC o uso de anti-helmíntico pode causar processos inflamatórios graves, ocasionando problemas muito sérios ao paciente (DRAELANTS et al., 1995b). O monitoramento da doença pode ser auxiliado pela pesquisa de antígenos, e sua identificação pode estar relacionada ao número de cistos viáveis (PARDINI et al., 2001), ou até mesmo, a resposta do paciente à droga contra o parasita. A terapia também pode ser auxiliada pela detecção de antígenos em paciente com NC (GARCIA et al., 2000).

ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS (ANTÍGENO E AcMo)

Um problema no diagnóstico da doença é a dificuldade de obtenção de antígenos a partir de larvas de suínos com infecção natural. Além de não garantir homogeneidade ou quantidades adequadas para a qualidade dos lotes produzidos, torna também inviável procedimentos de purificação pelo baixo rendimento obtido. A difícil extração das vesículas pela sua forte fixação às peças de suíno, favorece o rompimento das larvas no momento da manipulação, causando perda do material, principalmente do líquido vesicular, rico em proteínas de baixo peso molecular e considerado imunodominante (KUNZ et al., 1989; BUENO et al., 2000).

Os estudos visando fontes alternativas de antígenos (heterólogos) surgiram a partir das observações de reatividade cruzada entre os cestódeos, como a larva da *Taenia crassiceps* (Tcra), de reprodução assexuada, por brotamentos da vesícula em peritônio de camundongos. As larvas de Tso e de

Tcra partilham antígenos imunodominantes que podem ser empregados em testes imunológicos (ESPINDOLA et al., 2000 a).

Estudos realizados demonstraram reatividade cruzada entre cisticercos de Tcra e anticorpos anti-Tso em suínos (PARKHOUSE & HARRISON, 1987), e entre antígeno líquido vesicular (LV) 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., 1997 a e b). Por consequência, antígenos de Tcra são utilizados como alternativa de antígeno aplicado nos estudos da cisticercose (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997 b; BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000a e b; PARDINI et al., 2002; BRAGAZZA et al., 2002). A homologia parcial entre frações de 10 kDa das duas espécies (Tcra e Tso) já foi confirmada por seqüenciamento NH₂ terminal das proteínas (CHUNG et al., 1999).

Um estudo interessante sobre cisticercose é a análise da cinética dos antígenos produzidos e excretados pelas larvas de Tso (ES). A detecção de antígenos circulantes não significa necessariamente que o parasita esteja viável. Existe a possibilidade de serem detectados, no hospedeiro, proteínas resultantes da destruição do parasita, que podem permanecer por um determinado tempo na circulação (DRAELANTS et al., 1995b), e podem não ser caracterizadas como antígenos ES. Identificar os antígenos ES ajudaria a esclarecer se as larvas estão viáveis ou não. No entanto, um problema enfrentado por muitos pesquisadores na execução desses tipos de experimentos é a dificuldade de obtenção de formas viáveis a partir de pacientes. A existência das larvas de Tcra tornou possível o desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da cisticercose.

A dificuldade na obtenção de antígeno ocorre também nos estudos da cisticercose por *T. saginata* (Tsag) (ZARLENGA et al., 1994). Houve uma tentativa de utilizar antígeno obtido de *T. hydatigena*, mas não foi bem sucedida (RHOADS et al., 1985), por outro lado, frações <12 kDa de *T. hydatigena* foram utilizadas com sucesso em imunoensaios (HAYUNGA et al., 1991 e HAYUNGA & SUMMER, 1991). No entanto, a disponibilidade de antígeno obtido a partir de

T. hydatigena também é limitada, sendo necessário buscar outras alternativas. A utilização de antígeno de Tcra ajudou a resolver o problema de escassez de preparações antigênicas no diagnóstico da cisticercose bovina, e a fração contendo o peptídeo de 10 kDa de Tcra foi utilizada com potencial diagnóstico (ZARLENGA et al., 1994).

De um modo geral, para o diagnóstico da NC existe a tendência de utilização de antígenos mais puros e específicos (ZARLENGA et al., 1994), como glicoproteínas (RESTREPO et al., 2000), e que sejam de fácil obtenção. Como alguns métodos de purificação de glicoproteínas ainda são considerados de difícil execução (TSANG et al., 1989), existe um direcionamento na tentativa de obtenção de frações específicas por biologia molecular, com intuito de obter lotes reprodutíveis e suficientes para os ensaios (CHUNG et al., 1999; GREENE et al., 2000; SAKO et al., 2000), e inclusive a seleção tem sido feita com auxílio de sondas preparadas a partir de antígeno de fácil obtenção (*T. crassiceps*) (ZARLENGA et al., 1994). Esses métodos moleculares ainda devem continuar a ser utilizados como ferramentas importantes na busca e identificação de antígenos alternativos.

A obtenção de frações específicas de Tso também tem sido feita utilizando anticorpos monoclonais (AcMo) anti-Tso (NASCIMENTO et al., 1987), e a caracterização de glicoproteínas consideradas de valor potencial no diagnóstico na cisticercose tem sido realizada com auxílio de AcMo (HARRISON et al., 1989; DRAELANTS et al., 1995a).

Além da utilização de frações purificadas, com o propósito de melhor esclarecer o diagnóstico da cisticercose, a detecção de antígenos em amostras também pode trazer grandes contribuições no sentido de esclarecer a patologia. Testes padronizados com anticorpos policlonais têm sido utilizados na pesquisa de antígenos em pacientes com cisticercose, com resultados variáveis e que requerem melhores avaliações (ESTRADA & KUHN, 1985; ESTRADA et al., 1989; TELLEZ-GIRON et al., 1989; VELASCO-CASTREJÓN et al., 1989; CHOROMANSKI et al., 1990), sendo alguns considerados de baixa

sensibilidade (TELLEZ-GIRON et al., 1989, MONTENEGRO & MIRANDA, 1996), ou até mesmo não ideais para determinar a fase em que se encontra o cisto (TELLEZ-GIRON et al., 1989). Existem também relatos da utilização de policlonais anti-Tcra na pesquisa de antígenos de Tso em LCR de pacientes com NC (PARDINI et al., 2001).

A utilização de AcMo com especificidade definida seria uma potente ferramenta e ótima opção na detecção de antígenos na cisticercose.

No quadro amplo da investigação científica na área da saúde, observam-se inúmeras aplicações para os AcMo, devido ao fato destes anticorpos possuírem especificidade única. Dentre estas destacam-se a identificação de tumores, de estruturas protéicas, em testes de identificação de antígenos de histocompatibilidade, técnicas de purificação de moléculas por cromatografia de afinidade, de marcadores fenotípicos únicos para determinados tipos celulares e para análise funcional de moléculas secretadas ou de superfície celular (McMICHAEL & FABER, 1982). Também existem contribuições na imunoterapia utilizando AcMo, tais como no tratamento de câncer de mama (BENDELL et al., 2003); linfomas (CAMPBELL & MARCUS, 2003); artrite reumatóide (NAKAHARA et al., 2003); tumor (ZACCAGNA et al., 2003).

Uma grande evolução no imunodiagnóstico foi obtida após a utilização de AcMo (SANCHEZ, 2001), e com isso a pesquisa e caracterização de antígenos ganhou uma excelente ferramenta.

A produção de AcMo pode ser tanto por hibridização somática entre mieloma e linfócitos, gerando hibridomas, como por biologia molecular ou até mesmo pela tecnologia dos transgênicos.

A preferência em utilizar AcMo se justifica por se tratar de imunoglobulinas com especificidade única, e como tal representa um excelente instrumento na identificação de estruturas, principalmente no diagnóstico clínico. Quando são utilizadas misturas de anticorpos diferentes, muitas vezes a aplicação é limitada, devido à múltipla especificidade para diferentes epítomos antigênicos e heterogeneidade da resposta imune humoral (HARLOW & LANE,

1988). O soro policlonal contém muitos tipos diferentes de anticorpos, produzidos por vários clones de linfócitos B (anticorpos policlonais), específicos para diferentes antígenos (KÖHLER, 1984). Mesmo em animais hiperimunes, os anticorpos específicos para um determinado antígeno raramente ultrapassam um décimo dos anticorpos circulantes (HARLOW & LANE, 1988).

A primeira técnica para obtenção de anticorpos homogêneos ou monoclonais de especificidade definida foi descrita por GEORGES KÖHLER e CESAR MILSTEIN, em 1975. Esta técnica, amplamente utilizada atualmente, baseia-se no fato de que cada linfócito B produz anticorpo de especificidade única (SECHER, 1980; MINER et al., 1983) e consiste na fusão de células secretoras de anticorpo, isoladas de um animal imune, com células de mieloma, um tipo de tumor de linfócito B, não secretor de anticorpo, e imortal no qual foram induzidos falhas na via de síntese de nucleotídeos tornando-os deficientes nas enzimas hipoxantina fosforibosil transferase (HPRT) ou timidina kinase (TK), o que faz com que não sobrevivam em meio seletivo contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Dessa forma, somente os híbridos ou hibridomas sobrevirão, pois os linfócitos B morrem após 1 a 2 semanas em cultura (JANEWAY Jr & TRAVERS, 1997). As imunoglobulinas oriundas de um único clone (daí o nome monoclonal) possuem especificidade única.

Os AcMo possuem três características fundamentais: especificidade de ligação, homogeneidade e habilidade para ser produzido em quantidades ilimitadas, e dentre suas aplicações no diagnóstico, os AcMo servem também para pesquisa de antígenos liberados pelo parasita no hospedeiro.

Há poucos relatos sobre pesquisa de antígenos na cisticercose por Tso, principalmente utilizando AcMo. A avaliação comparativa da pesquisa de antígenos de Tso utilizando paralelamente AcMo e policlonal tem mostrado maior sensibilidade com AcMo (CORREA et al., 1989 a e b; MONTENEGRO & MIRANDA, 1996; ESPINDOLA et al., 2002). A maior sensibilidade associada à melhor especificidade obtida com AcMo, faz dessas proteínas as de escolha no

auxílio à pesquisa e estudo de antígenos na cisticercose humana, bovina e suína.

Um melhor esclarecimento da NC tem sido possível com a utilização de AcMo anti-Tso. A constatação de larvas viáveis em alguns pacientes com NC foi atribuída a utilização de AcMo anti-LV-Tso por meio da pesquisa de antígeno de Tso em LCR (CHANG-YUAN et al., 1992).

A reatividade cruzada observada entre AcMo anti-Tsag e antígeno de Tso abrem perspectivas para o emprego desses AcMo no diagnóstico da cisticercose por Tso. Além disso, antígenos ES detectados nessas amostras de soro foram importantes na compreensão da patologia, e foram caracterizados como glicoproteínas (HARRISON et al., 1989).

A avaliação da cinética de detecção de antígenos pode ajudar a esclarecer a relação parasita-hospedeiro, e auxiliar na determinação do estado em que se encontra o parasita, ou seja, se ele está íntegro, em processo inflamatório ou calcificado, direcionando assim a determinação de uma terapia ideal aplicada ao paciente. Nesse sentido, GARCIA et al. (2000), utilizando AcMo anti-Tsag puderam fazer a avaliação do efeito de droga anti-helmíntica sobre a morte de larvas de Tso em pacientes com cisticercose, e observaram que durante o período de tratamento foram detectados antígenos, negatizando após a morte dos parasitas. Em pacientes com larvas mortas ou calcificadas, submetidos ao tratamento, não foram detectados antígenos. Esse tipo de experimento foi muito útil para avaliar quais pacientes deveriam receber a droga, seu efeito sobre o parasita e o momento certo de suspender a terapia. Avaliação semelhante foi feita também por CHANG-YUAN et al. (1992), utilizando AcMo anti-LV-Tso.

Assim como a reação cruzada determinada por componentes comuns entre os parasitas pode auxiliar no diagnóstico, ela também pode dificultar a liberação diferencial de resultados na cisticercose, principalmente na detecção de anticorpos. Uma outra dificuldade que rotineiramente é observada em diferenciar as duas espécies é durante o exame parasitológico, pela dificuldade

que se tem em distinguir ovos de Tso e Tsag liberados por pacientes infectados com esses parasitas. Morfologicamente esses ovos são muito semelhantes, e pelo exame parasitológico é impossível fazer a diferenciação. Apesar dessas limitações, MONTENEGRO & MIRANDA (1996) conseguiram fazer o diagnóstico diferencial da teníase com a ajuda de AcMo anti-ovos de Tso. A distinção só foi possível devido a presença de antígenos espécie-específicos identificados pelo AcMo.

Há também poucos relatos da utilização de AcMo no estudo da cisticercose em animais. AcMo anti-Tsag com reatividade para glicoproteínas ES-Tsag foram utilizados na análise da cinética de antígeno ES-Tso em amostras de suínos com cistos viáveis (RODRIGUEZ-DEL-ROSAL et al., 1989). A propriedade do AcMo anti-Tsag em reconhecer glicoproteína ES-Tsag, juntamente com a característica de reagir cruzadamente com ES-Tso e ES-Tcra, fez com que SCIUTTO et al. (1998), utilizassem esses AcMo na pesquisa de antígenos em suínos infectados experimentalmente com ovos de Tso. Outros AcMo anti-ES-Tsag foram utilizados tanto para caracterizar glicoproteínas de Tsag (DRAELANTS et al., 1995a), como também para identificar glicoproteínas ES-Tso em suíno com cisticercose (CORREA et al., 1989 a). A reatividade heteróloga de AcMo anti-Tsag com Tso possibilitou sua utilização na análise da cinética da detecção de antígenos em pacientes com NC tratados com anti-helmíntico (NGUEKAM et al., 2003).

Os estudos da cisticercose por Tsag em gado também contam com a contribuição de AcMo. BRANDT et al. (1992) utilizaram AcMo anti-ES-Tsag na detecção de ES em soro de gado com cisticercose, e analisaram a cinética do aparecimento de antígeno ES em gados infectados experimentalmente com ovos de Tsag. Inclusive nesses experimentos foi possível diferenciar gados com cistos viáveis dos que possuíam apenas cistos mortos. A utilização desses AcMo juntamente com outros produzidos contra oncosfera de ovos de Tsag aumentou a sensibilidade de detecção de antígeno em soro de animais com cisticercose (KERCKHOVEN et al., 1998).

Teníase em hamsters por infecção experimental com Tso tem sido avaliada com auxílio de AcMo anti-Tso (AMBRÓSIO et al., 1997). Esses AcMo apresentaram reatividade com ES-Tso e foram muito úteis na avaliação da composição dos antígenos de Tso, fundamentais na fixação e posterior desenvolvimento do parasita no hospedeiro.

Os estudos de outras helmintoses humanas utilizando AcMo têm sido raros. Anticorpos monoclonais anti-*Echinococcus granulosus* foram utilizados para identificar antígenos circulantes em soro de humanos com hidatidose, bem como para identificar antígenos de cisto hidáticos (LIU et al., 1992). As observações de reação cruzada entre as espécies *E. granulosus* e *T. psiformis* foram melhor entendidas com auxílio de AcMo. LIU et al. (1993), constataram que a reatividade foi mais intensa entre AcMo anti-*E. granulosus* e antígeno homólogo que frente a antígeno heterólogo de *T. psiformis*.

De um modo geral, os antígenos ES detectados em humanos e animais com cisticercose são glicoproteínas e parecem ser bastante imunogênicos por serem eles o que apresentaram na maioria dos casos reatividade com os AcMo anti-cisticercos. Inclusive antígenos ES já se mostraram bastante imunogênicos na produção de AcMo anti-ES e com sucesso em sua aplicação na pesquisa de antígenos de Tso em LCR de pacientes com NC (ESPINDOLA et al., 2002).

A definição da composição dos parasitas é muito importante para compreender a relação parasita-hospedeiro, e cada vez mais se tenta saber quais as principais substâncias responsáveis por esse equilíbrio. A utilização de AcMo pode ser muito importante na definição da constituição do parasita. AMBRÓSIO et al. (1997), observaram que a especificidade de AcMo anti-Tso por actina e miosina de Tso levou a concluir que essas proteínas são as responsáveis pela fixação e posterior desenvolvimento das larvas em fase adulta no hospedeiro.

Sabendo da gravidade da NC por afetar o SNC e dos problemas enfrentados para seu diagnóstico, incluindo a dificuldade em obter antígeno a partir de suíno com infecção natural, foram produzidos AcMo a partir de

linfonodos de animais imunizados com antígenos de Tcra e Tso para serem utilizados na caracterização dos antígenos de Tcra e Tso e na obtenção de frações purificadas de Tcra com o propósito de melhorar as preparações antigênicas a serem aplicadas em testes imunológicos. Os AcMo podem trazer excelentes contribuições na pesquisa de antígenos em LCR ou soro de pacientes com NC já no início da doença, visando um diagnóstico precoce, antes mesmo da produção de anticorpos. Essas ferramentas podem também auxiliar no acompanhamento da evolução da doença de pacientes em tratamentos.

OBJETIVO

Visando contribuir nos estudos de diagnóstico da cisticercose humana, objetivamos nesse trabalho a caracterização de antígenos de *T. crassiceps*, *T. solium* e de *T. saginata*, bem como a pesquisa de anticorpos e antígenos em amostras de pacientes com NC utilizando anticorpos monoclonais obtidos para diferentes antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* e *T. solium*.

MATERIAL E MÉTODOS

1 – PARASITAS E EXTRATOS ANTIGÊNICOS

Os cisticercos de *T. crassiceps*, cepa ORF (Tcra), foram obtidos de camundongos BALB/c fêmeas experimentalmente infectados 90 dias após a inoculação intraperitoneal de 10 a 15 formas jovens, segundo metodologia descrita por BUENO et al. (2000). As larvas de *T. solium* (Tso) foram obtidas de músculos de suínos naturalmente infectados e as de *T. saginata* (Tsag) de músculos de bovinos (bezerros) infectados experimentalmente com ovos de *T. saginata* e foram cedidos pelo professor Antonio A M Maia da Faculdade de Zootecnia da Universidade do Estado de São Paulo, em Pirassununga, SP.

Os extratos antigênicos de escólex (E), membrana (M), total (T) de Tso e líquido vesicular (LV) de Tcra e Tso foram obtidos conforme descrito por BUENO (1999). Os antígenos total (T) e de escólex e membrana (EM) de Tsag foram gentilmente cedidos pelo professor Antonio A M Maia.

2 - OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO (ES) DE Tcra

Para iniciarmos a investigação do papel dos antígenos circulantes na cisticercose foram feitos estudos com larvas de Tcra em cultura para avaliar a produção e liberação de antígenos das larvas de Tcra. O parasita, pela sua complexidade, deve manter mecanismos de evasão, mas certamente, antígenos de excreção e secreção fazem parte de seu metabolismo essencial, e possivelmente estimulam o sistema imune do hospedeiro.

2.1 - MANUTENÇÃO DAS LARVAS EM CULTURA

Aproximadamente 900 larvas de Tcra foram cultivadas em garrafas de plástico estéreis contendo 20 mL de PFHM (protein-free hybridoma medium, Gibco, Grand Island, NY), suplementado com os antibióticos penicilina e estreptomicina na concentração de 50 µg/mL e fungizone 2,5 µg/mL (Gibco). As garrafas foram incubadas a 37°C em estufas de CO₂ a 5%, e as trocas do meio foram efetuadas nas 24, 48, 96 e 144 horas.

As vesículas foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto e brotamentos (FREEMAN, 1962), e contadas diariamente, sendo distribuídas em 2 grupos de acordo com seu aspecto, ou seja, larvas opacas (em degeneração) ou não.

2.2 - DEMONSTRAÇÃO DE VIABILIDADE DAS LARVAS DE Tcra APÓS CULTURA

Após o sexto dia de cultivo, as larvas foram lavadas em salina estéril e 4 camundongos BALB/c fêmeas foram inoculados intraperitonealmente com 15 larvas (sem sinais aparentes de degeneração) cada.

2.3 - "POOLS" ES E CONTROLES

Os materiais obtidos em cada dia deram origem a "pool" individuais de aproximadamente 200 mL (ES24, ES48, ES96 e ES144). Como controle foi utilizado líquido vesicular (C-LV), obtido por ruptura dos cistos na mesma proporção parasita/meio, e como controle negativo foi utilizado uma alíquota do meio. Os "pools" ES e controles foram concentrados aproximadamente 36X usando membrana YM-1 (Amicon, Beverl, MA) e estocados a -20°C.

3 – AMOSTRAS DE SOROS E LCR

Os soros hiperímunes anti-LV-Tcra e anti-T-Tso foram obtidos em coelhos segundo ESPÍNDOLA (1999).

Foram utilizadas alíquotas de 3 soros humanos negativos e 7 positivos para cisticercose e 13 LCR negativos e 33 positivos de pacientes com NC da coleção mantida no Laboratório de Imunologia da FCF/USP em freezer a -20°C. Dos LCR positivos, 2 eram de pacientes com cisto em processo de degeneração, 2 calcificados e os demais, assim como os pacientes com NC doadores das amostras de soro não apresentavam história da evolução do cisto. Essas amostras foram obtidas de pacientes do Hospital da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Protocolo de Investigação aprovado pelo Comitê de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa pela Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da FM/USP (aprovação no. 072/97) de acordo com a Resolução 196/96, Conselho Nacional da Saúde, Ministro da Saúde, Brasília, Brasil]. Parte dessas amostras foram utilizadas também no projeto de pesquisa "Avaliação da Resposta Imunológica na NC Humana" da doutora Ednéia Casagrande Bueno da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4 – CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE Tcra, Tso E Tsag

As proteínas dos antígenos (Tcra, Tso e Tsag) preparadas foram quantificadas e caracterizadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) corado pela prata. Para melhor caracterizar os antígenos, foi feito imunoblot com antígenos de Tcra frente a amostras de soro e LCR de pacientes com NC e soro de coelhos imunizados com LV-Tcra e T-Tso. Soros de camundongos imunizados com Tcra e Tso foram utilizados na caracterização de antígeno de Tcra e Tso.

4.1 – RENDIMENTO PROTÉICO DOS ANTÍGENOS DE Tcra, Tso E Tsag

As proteínas foram dosadas pelo método de LOWRY (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma) como padrão.

A dosagem protéica do antígeno ES-Tcra foi feita pelo micro BCA protein assay (Pierce Chem. Com., Rockford, EUA).

4.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS POR SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi executada para caracterizar a composição protéica dos extratos antigênicos, bem como para execução do imunoblot.

Os antígenos foram visualizados pela coloração com nitrato de prata.

Todo protocolo técnico do SDS-PAGE foi feito segundo LAEMMLI (1970) modificado por ESPÍNDOLA (1999).

A coloração pela prata foi feita em mini gel a 15% utilizando um kit comercial (Bio Rad) e foi utilizada nos experimentos de caracterização dos antígenos ES-Tcra, que incluíram “pools” ES, LV-Tcra e o controle C-LV.

A coloração pelo Coomassie blue foi executada segundo ESPÍNDOLA (1999).

4.3 - CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS POR IMUNOBLOT

Foi utilizada a técnica de imunoblot segundo TOWBIN et al., (1984) modificada por ESPÍNDOLA (1999), para identificar os peptídeos de reatividade cruzada entre Tcra obtido do modelo experimental (*T. crassiceps*) e da infecção humana (*T. solium*).

Os antígenos ES-Tcra foram caracterizados por imunoblot utilizando amostras de soros imunes de coelho anti-Tcra e anti-Tso, soro e LCR de pacientes com NC. As especificidades dos anticorpos anti-Tcra e anti-Tso

presentes nas amostras de soros dos grupos de camundongos foram analisadas por imunoblot com LV-Tcra e T-Tso.

Após a transferência das proteínas, as membranas obtidas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e, sob agitação contínua, foram lavadas com PBS (Na_2HPO_4 0,0075 M, NaH_2PO_4 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), e bloqueadas por 2 horas com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé) diluído em PBS-T. Novas lavagens foram feitas, e em seguida as tiras foram incubadas com 800 μl de amostras diluídas de acordo com o protocolo utilizado.

No imunoblot feito para caracterização do antígeno ES-Tcra, o gel utilizado foi a 15% e a membrana cortada em tiras foi incubada com soros de coelhos imunizados com LV-Tcra ou T-Tso diluídos 1:50 e 1:80 respectivamente; soro e LCR de paciente com NC diluídos 1:50 e 1:5, respectivamente. Foram utilizadas 1 amostra de soro e 4 LCR de pacientes com NC, 4 destes com fase larvária definida, dois com parasitas em processo degenerativo e dois em fase de calcificação, sendo que um de cada grupo era negativo para anticorpos no LCR (bioELISA neurocisti, Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil). Após incubação durante 15-18 horas sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens. Foi adicionado 800 μl do conjugado anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Cambridge Biotech Corporation, Raritan, N.J., USA) diluído a 1:4000 para soro e 1:2000 para LCR e conjugado anti-IgG de coelho fosfatase alcalina 1:2000 (Sigma). A reação foi incubada por uma hora. Após 4 lavagens em PBS-T e 1 vez em água, foi adicionado 800 μl do substrato preparado com nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (NBT/BCIP) (Sigma). No imunoblot utilizando anti-IgG humana, a última lavagem foi feita em tris-salina (T/S; Tris-hydroxymethylaminoethane 0,01 M e NaCl 0,15 M, pH 7,4), e foi utilizado 3,0 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) como cromógeno dissolvido em 1,0 mL de metanol e 5,0 mL de T/S, mais 5 μl de água oxigenada. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água.

Nos imunoblot feitos para identificação dos peptídeos de Tcra (SDS-PAGE 5 a 20%) por anticorpos presentes em soro de camundongos imunizados com Tcra, as membranas foram incubadas com soros diluídos a 1:40 (IgA), 1:100 (IgM) ou 1:500 (IgG). O conjugado utilizado foi anti-IgM e anti-IgA (Sigma) de camundongo-peroxidase diluídos a 1:1000 e anti-IgG de camundongo-peroxidase diluído a 1: 2000. Nos imunoblot utilizando antígeno de Tso e antígeno de Tcra (este com anticorpo anti-Tso), os soros de camundongos foram diluídos 1:40 e conjugado 1:500.

5 – OBTENÇÃO DOS AcMo

Foram produzidos hibridomas por fusão dos linfócitos dos animais imunizados com antígeno de Tcra e Tso com células de mieloma SP2O.

5.1 - IMUNIZAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Animais Experimental da FCF/USP (13/2003), aprovado pelo Comitê Brasileiro de Animais Experimental (COBEA).

Cinco grupos de 4 camundongos BALB/c foram imunizados pela via subplantar com 20 µg de antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso, T-Tso e E-Tso em 25 µl salina (NaCl 0,15 M) previamente emulsificados na mesma proporção em ACF. Após 19 dias, os animais receberam uma dose reforço pela mesma via e mesma quantidade de antígeno, no entanto a emulsão foi feita com AIF. Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico nos tempos zero, 8ºd, 12ºd, 19ºd, 31ºd e 44ºd. Os animais imunizados com ES-Tcra foram sangrados nos tempos zero, 8ºd, 19ºd e 29ºd. Os soros foram mantidos em repouso por 2 h, e em seguida foram centrifugados a 900 g por 5 min a temperatura ambiente. Os soros foram estocados a -20°C até o momento do uso.

5.2 – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM Tcra E Tso

A técnica utilizada para determinação da cinética dos anticorpos nos soros dos camundongos foi "ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY" (ELISA). Inicialmente, as placas de microtitulação de 96 cavidades, em fundo plano maxisorp (NUNC, Dinamarca) foram sensibilizadas com antígeno LV-Tcra, LV-Tso, T-Tso ou E-Tso, na proporção de 1 µg de antígeno em 100 µl de tampão carbonato/bicarbonato 0,5 M, pH 9,6, por cavidade, e então, incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina contendo Tween 20 a 0,05% (solução salina-T). Em seguida, foi feito o bloqueio durante uma hora distribuindo-se em cada cavidade 200 µl de leite mólico (Nestlé) a 5% em PBS-T. Foram repetidas as lavagens e, então, adicionados 100 µl dos "pool" de soro de camundongos diluído 1:500 ou 1:10 (IgA). Após novas lavagens, foram acrescentados 100 µl dos conjugados: anti-IgM e anti-IgG de camundongo-peroxidase diluídos a 1:2000 e anti-IgA de camundongo-peroxidase diluído a 1: 1000; e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas novamente e incubadas com 100 µl de substrato constituído de 10 mg de orto-fenilenodiamina (OPD/Sigma), 10 µl de água oxigenada e 10 mL de tampão citrato/fosfato a 0,2 M, pH 5,0 por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da reação foi feita espectrofotômetro (SLT spectra, SLT Labinstruments, Áustria) em comprimento de onda 492 nm.

5.3 – OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE LINFONODO POPLÍTEO

Foi utilizado 1 camundongo de cada grupo para a fusão celular. Três dias antes da fusão celular, que corresponde 2 dias após ter sido realizada a última coleta da amostra de sangue, foi dado o reforço contendo a mesma dose

(20µg) em solução salina. Os linfonodos poplíteos dos camundongos imunizados foram retirados assepticamente, e macerados com bastão de vidro sobre peneira metálica de malha fina com meio de cultura RPMI⁻, preparado com RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com L-glutamina (Gibco) a 1%, piruvato de sódio (Gibco) a 2%, MEM não essenciais (Gibco) a 1%, gentamicina (Gibco) a 0,1% e HEPES (Gibco) a 1,5%. Os linfócitos foram reservados para técnica de fusão celular.

5.4 – CULTIVO DAS CÉLULAS DE MIELOMA

Cinco dias antes da fusão celular, as células de mielomas SP2-O foram retiradas do tanque de nitrogênio líquido e rapidamente descongeladas a 37°C, transferindo-se em seguida para um tubo cônico contendo 15 mL de meio RPMI⁺, que corresponde ao RPMI⁻ acrescido de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) a 10%. As células foram centrifugadas a 800 g durante 5 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, transferidas para uma garrafa de 25 cm² e expandidas para garrafas de 250 cm² contendo meio RPMI⁺. As garrafas foram incubadas a 37°C em ambiente de CO₂ a 5%, e expandidas, de modo a ficar em fase logarítmica de crescimento um dia antes da fusão (acertando a concentração para 5 X 10⁴ células/mL).

5.5 – PREPARO DO “FEEDER LAYER”

Um dia antes da fusão celular foi obtido o “feeder layer”, injetando 5 mL de RPMI⁺ no peritônio de um camundongo, massageando o abdomen e em seguida aspirado com auxílio de uma seringa. O lavado peritonial foi então diluído em 45 mL do mesmo meio, e distribuído em placas de cultura estéreis de 96 cavidades. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.

5.6 – OBTENÇÃO DOS HIBRIDOMAS (FUSÃO CELULAR)

A fusão celular foi realizada de acordo com KÖHLER & MILSTEIN (1975), com algumas modificações. Os linfócitos e as células mielomatosas foram lavados separadamente em RPMI⁻ por centrifugação durante 5min a 800 g. Foi descartado o sobrenadante e adicionado 10 mL do mesmo meio, tanto nos linfócitos, como nas células de mieloma. Foi feita a contagem das células diluídas 1:2 em tripan blue (Gibco) a 0,1%. As células foram misturadas na proporção 2:1 ou 1:1 (linfonodo/mieloma), e após centrifugação foi realizada a fusão celular com o "pellet" utilizando uma solução, previamente autoclavada de 0,5 g de polietilenoglicol (Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído em 0,7 mL de PBS contendo 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) gota a gota, por 1 min a 37°C. Na sequência, as células foram mantidas em repouso por 1,5 min a 37°C, e foi adicionado 1 mL de RPMI⁻, gota a gota por 1 min a 37°C, e mais 20 mL do RPMI⁻, gota a gota por 4 min a 37°C. As células foram então mantidas em repouso por 4 min a 37°C. Em seguida foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI⁺, contendo HAT (Gibco) a 3% na proporção de 1×10^6 células por mL de meio. Após 2 horas de incubação a 37°C, as células foram distribuídas em volume de 100 µl por orifício em placas contendo "feeder layer", e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

A primeira troca do meio foi realizada após 3 dias e as subseqüentes a cada 2 dias, e após 1 semana, o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Gibco) a 2% e mantido por mais 2 semanas, quando passou-se a utilizar RPMI⁺. A seleção dos clones por ELISA foi iniciada dez dias após a fusão celular, quando os hibridomas já se apresentavam com bom crescimento celular (ocupando 1/3 do poço). O ELISA para a seleção dos clones foi feito com antígenos LV-Tcra, LV-Tso, T-Tso ou E-Tso. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG de camundongo pelo maior interesse em obter AcMo do isótipo IgG.

5.7 - CLONAGEM DOS HIBRIDOMAS

Os hibridomas obtidos da fusão a partir de animais imunizados com antígeno de Tcra e Tso, que apresentaram reatividade por ELISA foram clonados por diluição limitante. Inicialmente, os hibridomas foram corados com tripan blue, e posteriormente contados. Na sequência, as células foram diluídas em RPMI⁺, de modo que ficassem distribuídas na proporção 1 célula por poço de placas de 96 cavidades. No dia seguinte, os hibridomas foram observados em microscópio, e foram selecionados apenas os poços que apresentava uma célula. Uma camada de “feeder layer” foi adicionada para auxiliar o crescimento celular. Os ELISA foram realizados quando as células clonadas atingiram um crescimento exponencial (aproximadamente 8 dias).

De cada hibridoma clonado, o poço que apresentava maior densidade óptica por ELISA era selecionado para ser re-clonado, e esta segunda clonagem foi calculada de modo que as células ficassem distribuídas na proporção 0,5 célula por poço nas placas de 96 cavidades. As células selecionadas na re-clonagem foram isotipadas e expandidas *in vitro* ou *in vivo*.

5.8 – CONGELAMENTO DOS HIBRIDOMAS E CÉLULAS DE MIELOMAS

Para o congelamento, tanto os mielomas como as células híbridas foram centrifugados a 800 g por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Um volume de 1mL da solução contendo 10% de DMSO (Sigma) preparada em SFB, previamente ambientada em banho de gelo, foi adicionada gota a gota em aproximadamente 2×10^6 células. Na sequência as células foram rapidamente congeladas a -80°C , e no dia seguinte foram transferidas para o nitrogênio líquido.

5.9 - ISOTIPAGEM DOS AcMo

Os isótipos dos AcMos foram determinados por ELISA. As placas foram sensibilizadas com 100 µl de AcMo anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM de camundongo (Sigma) diluídos 1:1000 em PBS e incubadas durante 16h a 4°C. Na sequência, as placas foram lavadas com solução salina-T e bloqueadas por 1 h com 200 µl de leite 5%. Repetidas as lavagens, foram incubadas com 100 µl de sobrenadante de cultura. Após 1 hora a 37°C foram feitas novas lavagens e adicionado 100 µl do conjugado de anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição de 1:2000 em leite 1%. Após a incubação de mais 1 hora a 37°C, novas lavagens foram feitas, e a reação foi revelada com substrato preparado com 1 mL de água oxigenada e 9 mL de uma solução contendo 3, 3', 5, 6' – tetrametilbenzidine (TMB) (Bio Rad). A leitura foi feita a 450 nm.

5.10 – OBTENÇÃO DE AcMo POR EXPANSÃO DOS HIBRIDOMAS

Os hibridomas clonados foram expandidos seqüencialmente em placas de 24 orifícios, garrafas de 25 cm² e garrafas de 250 cm², quando foram centrifugados, ressuspensos em 200 µl de salina, e injetados intraperitoneal (i.p.) em camundongos para produção de ascite. Foi utilizado cerca de 10 animais por clone. Esses animais foram previamente tratados com 500 µl de AIF i.p. 21 dias antes da inoculação, e um dia antes da inoculação das células, os animais foram irradiados. O crescimento das células proporcionou aumento do peritônio do animal, e quando atingiram um bom crescimento (aproximadamente 10 dias), os animais foram sacrificados, e o líquido ascítico foi retirado do peritônio dos animais, centrifugado a 5000 g por 10 minutos, e o sobrenadante congelado a -20°C.

5.11 – PURIFICAÇÃO DOS AcMo POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE COM PROTEÍNA A

O processo de purificação dos AcMo iniciou com tratamento do líquido ascítico para retirar os lipídeos, adicionando 20 µl de uma solução de sulfato de dextran a 10% e 100 µl de CaCl₂ 1 M por mL de ascite, sob agitação por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 5000 g por 10 min, e o sobrenadante dialisado contra tampão borato-salina (tampão borato: ácido bórico 0,1 M, tetraborato de sódio 0,1 M e cloreto de sódio 1 M, pH 8,5 diluído 1:20 em NaCl 0,15 M) por 48 horas.

Os AcMo dos fluidos ascíticos deslipidados foram purificados por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna de Proteína A (Pharmacia). Inicialmente, a coluna foi equilibrada com tampão borato-salina, e na sequência foram aplicados 5 mL do líquido ascítico. Após 5 minutos, a coluna foi lavada com mesmo tampão até a saída total do primeiro pico. O tampão glicina/HCl (glicina 0,2 M e cloreto de sódio 0,15 M, pH 2,8) foi utilizado para a eluição das moléculas de IgG que se ligaram a proteína A. Após a coleta desse segundo pico, a coluna foi novamente equilibrada com tampão borato-salina. As amostras coletadas com o tampão glicina/HCl foram imediatamente neutralizadas com Tris 1 M. Os eluatos foram concentrados ao volume inicial utilizando membrana YM-10, dialisados contra tampão borato-salina, e estocados a -20°C. A concentração das proteínas em cada tubo coletado foi avaliada em espectrofotômetro (DU 640 spectrophotometer, Beckman, CA, USA) a 280 nm.

6 – DETERMINAÇÃO DA AFINIDADE DO AcMo ANTI-ES-Tcra

As constantes de dissociação (K_d) da interação antígeno-anticorpo foram determinadas sob condições de equilíbrio de acordo com o método descrito por FRIGUET et al. (1985), após a purificação das imunoglobulinas contidas nos

respectivos líquidos ascíticos, em coluna de proteína A-Sepharose. A diluição de anticorpos monoclonais foi escolhida na parte linear da curva de titulação de ELISA, correspondentes a 50% da absorbância máxima e incubadas por 18 horas a 4°C com várias concentrações de LV-Tcra. Após esta etapa, 100 µl de cada solução foram transferidos para placas de microtitulação previamente sensibilizadas com LV-Tcra e bloqueadas com leite 5%. A presença de anticorpos livres foi então detectada pela reação convencional de ELISA, após o tempo de incubação de 30 minutos. Para a obtenção das constantes de dissociação utilizamos a equação de “Scatchard plots” descrito por FRIGUET et al. (1985). Para aplicação da equação (descrita abaixo), utilizamos a absorbância máxima (A_{max}) obtida no teste, a absorbância que corresponde a 50% de inibição da ligação do AcMo ao antígeno ($A_{50\%}$) e o número de moles de antígeno (n) necessária para esta inibição da absorbância em 50%.

$$\frac{A_{max}}{A_{max} - A_{50\%}} = 1 + \frac{Kd}{n}$$

7 – REATIVIDADE DOS AcMo

O protocolo do ELISA seguiu o do item 5.2, com algumas modificações. Os testes foram feitos utilizando 1 µg de antígeno LV-Tcra, LV-Tso, T-Tso e E-Tso por poço. Os AcMo foram diluídos 1:1000 e conjugado anti-IgG de camundongo-peroxidase 1:2000. O substrato utilizado foi água oxigenada e TMB. A leitura foi feita em 450 nm.

8 – ESPECIFICIDADE DOS AcMo FRENTE A ANTÍGENOS DE CISTICERCOS

A especificidade dos AcMo anti-LV-Tcra, anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso frente a antígeno de Tcra, Tso ou Tsag foi avaliada por imunoblot.

As amostras foram submetidas ao SDS-PAGE com gradiente de concentração de acrilamida de 5 a 20% e transferidas para uma membrana de PVDF. A técnica do imunoblot seguiu o protocolo do item 4.3 com algumas modificações. Os AcMo foram diluídos 1:1000 e o conjugado anti-IgG-fosfatase alcalina de camundongo diluído 1:2000. Foi utilizado NBT/BCIP como substrato.

9 – UTILIZAÇÃO DOS AcMo

9.1 - CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO LV-Tcra, T-Tso E LCR COM AcMo ANTI-Tcra ACOPLADO À SEPHAROSE

Os AcMo anti-Tcra foram acoplados à Sepharose ativada e utilizados para preparar colunas de afinidade e purificar os antígenos LV-Tcra, T-Tso e LCR de pacientes com NC. Em cada purificação, foi utilizado um volume de 10 mL de LV-Tcra a 1,4 mg/mL e 2 mL de T-Tso a 8 mg/mL. Foi utilizado um "pool" de 20 mL de LCR de pacientes com NC concentrado utilizando PEG a um volume final de 2 mL.

Para o acoplamento do AcMo à resina, aproximadamente 1 grama de resina Sepharose 4B ativada (Pharmacia) foi suspensa em 10 mL de HCl 1 mM. O gel inchado foi imediatamente lavado em 200 mL desse ácido e com 50 mL tampão de acoplamento (NaHCO_3 1,0 M e NaCl 0,5 M, pH 8,3) em um funil de porcelana adaptado a uma placa porosa. Após esse procedimento, foram misturados o AcMo, previamente dialisado contra o tampão de acoplamento, na

proporção de 3 mg de AcMo para cada mL de resina. A mistura foi mantida sobre agitação por 2 horas a temperatura ambiente. Uma amostra do sobrenadante foi retirada para calcular a porcentagem de conjugação do AcMo à resina. Os grupos ativados da resina que não se ligaram ao AcMo foram bloqueados por 2 horas sob agitação, com glicina na concentração final de 3,5% (P/V). A resina foi então mantida em repouso por 16 horas a 4°C. Posteriormente, foram feitas 3 lavagens com tampão glicina/HCl, alternando com o tampão borato/salina para retirar os AcMo que não se ligaram a Sepharose 4B. Em seguida, a coluna foi montada e utilizada para fracionamento dos antígenos LV-Tcra e T-Tso, assim como do LCR, com objetivo de purificar as frações protéicas específicas para o AcMo ligado à resina.

O antígeno LV-Tcra foi purificado com coluna de afinidade Sepharose 4B, preparada com AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra. Para a purificação do T-Tso e LCR foi utilizada a coluna preparada com AcMo anti-ES-Tcra. Inicialmente, as amostras previamente dialisadas contra o tampão borato-salina foram aplicadas à coluna, e seguiu-se lavagem com o mesmo tampão até a saída total do primeiro pico das amostras. Para eluição das proteínas ligadas, foi utilizado o tampão glicina/HCl 0,2 M, pH 2,8. Após a coleta das amostras do segundo pico, a coluna foi novamente equilibrada com o tampão borato-salina. As amostras coletadas foram neutralizadas com Tris a 1,0 M. Os eluatos dos antígenos coletados no segundo pico foram concentrados em membrana YM-1, e dialisados contra o tampão borato-salina. As amostras foram estocadas a -20°C.

9.1.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE LV-Tcra POR SDS-PAGE

As proteínas de LV-Tcra purificadas por imunoafinidade com AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra foram dosadas pelo método de LOWRY (LOWRY et al.,

1951), e fracionadas por SDS-PAGE (em mini-gel) a 15% com posterior coloração pelo Coomassie blue, segundo ESPÍNDOLA (1999).

9.1.2 – PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO

Testes preliminares mostraram que não houve sucesso na adsorção das frações purificadas na fase sólida de placas de poliestireno. As glicoproteínas presentes em grande quantidade no antígeno parecem ter dificultado a ligação nas placas, e por esse motivo a pesquisa de anticorpo anti-Tso utilizando as frações purificadas foi feita por imunoblot e dot-ELISA.

9.1.2.1 - PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR E SORO DE PACIENTES COM NC POR IMUNOBLLOT, UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO COM AcMo ANTI-LV-Tcra

As amostras foram fracionadas por SDS-PAGE a 15% e transferidas para uma membrana de PVDF. A técnica do imunoblot seguiu o protocolo do item 4.3 com algumas modificações. Foram utilizados 2 LCR negativos e 3 positivos, 2 soros negativos e 2 positivos de pacientes com NC. As amostras de LCR e soro foram diluídas 1:5 e 1:50, respectivamente. Foram utilizados como conjugados anti-IgG humana biotilado/avidina-peroxidase diluídos 1:2000. O cromógeno utilizado 4-cloro-1-naftol. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água.

9.1.2.2 - PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR E SORO DE PACIENTES COM NC POR DOT-ELISA, UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO COM AcMo ANTI-LV-Tcra

O antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra foi diluído inicialmente 1:2 em água, em seguida 1:5 em tampão de amostra 5X concentrado (tampão/amostra), e aplicado 2 µl (0,18µg) na nitrocelulose. As membranas ficaram 5 min a 37°C, e em seguida sob agitação contínua, foram lavadas com PBS-T, e bloqueadas com leite desnatado a 5% PBS-T por 2 horas. Foram feitas novas lavagens e adicionados 800µl de 2 amostras de LCR negativos e 4 positivos de pacientes com NC, diluídas 1:5 e uma amostra de soro negativo e 4 positivos, diluídas 1:50. Após incubação durante 15-18 horas sob agitação contínua, foram repetidas as lavagens, e adicionado 800 µl dos conjugado anti-IgG humana biotilado/avidina-peroxidase diluído a 1:2000. A reação foi incubada por uma hora. Após 4 lavagens em PBS-T e 1 com T/S foi adicionado 800 µl do cromógeno 4-cloro-1-naftol preparado de acordo com o protocolo já descrito. A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água.

9.2 – PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO ANTÍGENOS DE Tcra E Tso

Os ensaios foram feitos por ELISA segundo o item 5.2, com algumas modificações. Inicialmente, as placas de microtitulação foram incubadas com 50µL de antígeno ES-Tcra diluído 1:50 ou 1 µg dos antígenos LV-Tcra, LV-Tso ou T-Tso, diluídos em tampão carbonato/bicarbonato por poço, e então, incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas. Após a incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com solução salina-T, e bloqueadas por 1 hora a 37°C com leite a 5% em PBS-T. Os AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) foram diluídos 1:40.000 e incubados com a mesma proporção

de LCR, diluído previamente 1:32 ou então foram efetuadas previamente misturas dos diferentes AcMo em proporções iguais, e o mesmo volume de LCR diluído previamente 1:32, foi adicionado. Uma alíquota contendo 100 µl dessas misturas finais ou de LCR 1:32 foi incubada em placa por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foram acrescentados 100 µl do conjugado anti-IgG-humana-peroxidase diluído 1:2000; e as placas foram incubadas por uma hora a 37°C. Em seguida, foram repetidas as lavagens e incubadas com 100 µl de água oxigenada e TMB, por 15 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100 µl de ácido sulfúrico 4 N. A leitura da reação foi feita no espectrofotômetro em comprimento de onda a 450 nm.

9.3 – AVALIAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTÍGENO LV-Tcra UTILIZANDO AcMo

As propriedades imunoquímicas do antígeno LV-Tcra após tratamento por aquecimento, com boroidreto de sódio, ácido tricloroacético (TCA) e periodato de sódio foram analisadas com AcMo anti-Tcra e anti-Tso por ELISA e imunoblot. Para todos os tratamentos, o antígeno LV-Tcra foi utilizado na concentração inicial de 30 µg/mL.

9.3.1 - TRATAMENTO DO ANTÍGENO LV-Tcra POR AQUECIMENTO

No tratamento por aquecimento, o antígeno LV-Tcra foi incubado durante 15 minutos a 100°C.

9.3.2 - TRATAMENTO DO ANTÍGENO LV-Tcra COM BOROIDRETO DE SÓDIO (NaBH₄)

Para o tratamento com boroidreto de sódio, o antígeno LV-Tcra foi diluído 1:2 em solução de NaBH₄ 0,5 M preparado em KOH 0,1 M, e incubado por 16 h

no escuro em ambiente de nitrogênio a 37°C. A seguir, foi adicionado 30 µl de ácido acético a 2 N por mL de antígeno tratado, e dialisado por 24 h em PBS, pH 7,2 a 4°C. Como controle, o antígeno LV-Tcra recebeu o mesmo tipo de tratamento, porém sem NaBH₄.

9.3.3 - TRATAMENTO DO ANTÍGENO LV-Tcra COM ÁCIDO TRICLOACÉTICO (TCA)

O antígeno LV-Tcra foi diluído 1:2 em solução de TCA a 10%, e incubado por 30 min em banho de gelo. Em seguida foi centrifugado por 20 min a 15.000 g, e o sobrenadante foi dialisado contra PBS, pH 7,2 a 4°C. Foi feito um controle tratando o antígeno com mesma técnica sem TCA.

9.3.4 - TRATAMENTO DO ANTÍGENO LV-Tcra COM ÁCIDO PERIÓDICO (H₅IO₆)

O antígeno LV-Tcra foi diluído 1:2 em soluções de ácido periódico 400 mM preparado em acetato de sódio 0,3 M, pH 4,7. A incubação foi feita por 2 hora a temperatura ambiente em escuro. Em seguida foi adicionado o mesmo volume de NaBH₄ 370 mM preparado em PBS, pH 7,2, e incubado por 4 horas a temperatura ambiente. O antígeno foi dialisado contra PBS, pH 7,2 4°C. O controle do LV-Tcra recebeu o mesmo tipo de tratamento, porém sem ácido periódico.

9.3.5 - REATIVIDADE DO ANTÍGENO LV-Tcra ANTES E APÓS TRATAMENTOS

O protocolo técnico do ELISA seguiu o do item 5.2 com algumas modificações. As placas foram sensibilizadas com os antígenos diluídos em carbonato-bicarbonato em diluições seriadas a partir de 1:40. Os AcMo anti-LV-

Tcra, anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) foram diluídos 1:1000 e conjugado anti-IgG de camundongo a 1:2000. Foi utilizado como substrato água oxigenada e TMB. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm.

9.3.6 - ESPECIFICIDADE DO ANTÍGENO LV-TCRA ANTES E APÓS TRATAMENTO

As amostras foram submetidas ao SDS-PAGE (mini-gel) a 15% e transferidas para membrana de PVDF. O protocolo técnico foi de acordo com item 4.3, com algumas modificações. Os AcMo anti-LV-Tcra, anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) foram diluídos 1:1000 e conjugado anti-IgG de camundongo-fosfatase alcalina 1:2000. O substrato utilizado foi NBT/BCIP.

9.4 - PESQUISA DE ANTÍGENO DE Tso EM LCR DE PACIENTE COM NC UTILIZANDO AcMo ANTI-ES-Tcra E ANTI-LV-Tcra

Os AcMo anti-Tcra foram utilizados na pesquisa de antígeno de Tso em LCR de pacientes com NC por ELISA e imunoblot.

9.4.1 - PESQUISA DE ANTÍGENO DE Tso EM LCR DE PACIENTE COM NC POR ELISA UTILIZANDO AcMo anti-Tcra

O teste seguiu o protocolo do item 5.2 com algumas modificações. Inicialmente as placas foram incubadas com LCR diluídos 1:2 em tampão carbonato/bicarbonato, por cavidade, e então, incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas. O bloqueio foi feito por 2 horas com leite a 5% em PBS-T, e o AcMo anti-ESTcra foi diluído 1:200 e incubado por 1 hora. O conjugado anti-IgG-peroxidase de camundongo foi diluído 1:2000 com incubação de 1 hora. O substrato foi preparado utilizando água oxigenada e TMB. A leitura foi feita em 450 nm.

9.4.2 - PESQUISA DE ANTÍGENO DE Tso EM LCR DE PACIENTE COM NC POR IMUNOBLOT UTILIZANDO AcMo anti-Tcra

As amostras de LCR preparadas numa proporção de 1:5 (tampão de amostra/LCR) foram fracionadas por SDS-PAGE (mini-gel) a 15%, e transferidas para membrana de PVDF. O protocolo técnico do imunoblot seguiu o do item 4.3 com algumas modificações. O AcMo anti-ES-Tcra foi diluído 1:1000 e conjugado anti-IgG-fosfatase alcalina de camundongo diluído 1:2000. Foi utilizado NBT/BCIP como substrato.

10 – OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE Tcra E Tso NECESSÁRIOS AO SEQUENCIAMENTO

Após o fracionamento por SDS-PAGE (mini-gel) a 15% dos antígenos de LV-Tcra (purificados ou não), T-Tso e LCR purificados por imunoafinidade, os mesmos foram transferidos para membrana de PVDF 0,2 μ , segundo a metodologia descrita por TOWBIN et al. (1979), com algumas modificações. Inicialmente, o gel foi mergulhado em tampão CAPS (Pharmacia) preparado a 0,22% em etanol a 10%, e em seguida, a transferência foi feita utilizando esse mesmo tampão, durante 15 a 18 horas a 4°C. As membranas foram então lavadas 3 vezes em água e coradas em Coomassie blue-R (Bio Red) previamente dissolvido em metanol a 50%. A membrana foi descorada em metanol a 50% e ácido acético a 10%. A água utilizada neste protocolo técnico foi bi-destilada. A membrana foi armazenada a -20°C. O sequenciamento foi realizado pelo Dr Greene, na Faculdade de Química de Ribeirão Preto. O equipamento utilizado para o sequenciamento foi o Procise modelo 491 – PE applied Biosystems.

RESULTADOS

1 – EXTRATOS ANTIGÊNICOS

1.1 - RENDIMENTO PROTÉICO DOS ANTÍGENOS DE Tcra, Tso e Tsag

Na tabela 1 está apresentado o total de proteínas obtidos de Tcra, Tso e Tsag.

Tabela 1. Quantidade total de proteínas obtidos dos extratos antigênicos de Tcra, Tso e Tsag.

Antígeno	Total de proteína (mg)
LV-Tcra	128,0
LV-Tso	7,2
T-Tso	44,2
E-Tso	34,3
M-Tso	24,0
T-Tsag	57,0
EM-Tsag	32,8

LV-Tcra: antígeno líquido vesicular de Tcra

LV-Tso: antígeno líquido vesicular de Tso

T-Tso: antígeno total de Tso

E-Tso: antígeno de escólex de Tso

M-Tso: antígeno de membrana de Tso

T-Tsag: antígeno total de Tsag

EM-Tsag: antígeno de escólex e membrana de Tsag

Tcra: *T. crassiceps*

Tso: *T. solium*

Tsag: *T. saginata*

1.2 – CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS POR SDS-PAGE CORADO PELO NITRATO DE PRATA

A figura 1 mostra o perfil eletroforético dos antígenos obtidos de *Tcra*, *Tso* e *Tsag* corados pelo nitrato de prata.

Fig. 1 - SDS-PAGE (15%) dos antígenos de *T. crassiceps*, *T. solium* e *T. saginata* corados pelo nitrato de prata, aplicados 7 μ g/mm (35 μ g/poço): (1) LV-Tcra; (2) LV-Tso; (3) T-Tso; (4) E-Tso; (5) T-Tsag e padrão de massa molecular.

O antígeno LV-Tcra (Fig.1, 1) apresentou uma maior concentração de proteínas abaixo de 20 kDa. O antígeno LV-Tso (Fig. 1, 2) também é constituído de grande quantidade de proteínas <20 kDa. O padrão dos antígenos T-Tso, E-Tso e T-Tsag (Fig. 1, 3-5), apresentou várias frações protéicas distribuídas entre 94- e 10- kDa.

2 – OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE Tcra (ES-Tcra)

Um total de 120 novas vesículas de Tcra foram obtidas por brotamento após 48 h de cultivo e 580 vesículas mostraram sinais de degeneração (opacidade) após 144 h.

2.1 - RENDIMENTO PROTÉICO DOS ANTÍGENOS ES-Tcra

Na tabela 2 estão apresentadas as quantidades de proteínas secretadas/excretadas pelas larvas de Tcra durante o cultivo das vesículas em meio de cultura, e dos controles.

Tabela 2. Quantidade de larvas em cultura e quantidade total de proteínas liberadas por larva durante o cultivo das larvas em meio de cultura, e dos controles.

Antígenos	Proteína total (mg)	Proteína por larvas (µg)	Larvas sem e com opacidade
ES24	1,170	1,3	900 – zero
ES48	5,304	5,2	1020 – zero
ES96	0,010	0,023	440 – 580
ES144	0,022	0,049	440 – 580
C-LV	99,0	110,0	...
LV-Tcra	31,5	35,0	...

ES24, ES48, ES96 e ES144: "pool" dos antígenos produzidos e liberados pelas larvas em cultura nas 24, 48, 96 e 144h, respectivamente.

LV-Tcra: antígeno líquido vesicular de Tcra (controle).

C-LV: antígeno obtido por ruptura dos cistos de Tcra na mesma proporção parasita/meio (controle).

A quantidade de proteínas dos antígenos C-LV e LV-Tcra foi 110 e 35µg por larva, respectivamente. O cultivo das 900 larvas resultou na obtenção de

1,3 µg de proteínas nas 24 h e 5,2 µg nas 48 h por larva. Após este período a quantidade de proteínas produzida pelas larvas foi muito baixa.

2.2 – PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ANTÍGENOS ES-Tcra

A figura 2 mostra o resultado da separação por SDS-PAGE dos “pools” ES obtidos durante o cultivo das larvas de Tcra em meio de cultura e dos controles, corados pelo nitrato de prata.

Fig. 2 - SDS-PAGE (15%) dos “pools” dos antígenos produzidos e liberados pelas larvas durante o intervalo de 144 h de cultura (ES) e controles (C-LV e LV-Tcra) corados pelo nitrato de prata: (1) ES24; (2) ES48; (3) ES96; (4) ES144 (coletados 24, 48, 96 e 144 horas respectivamente após cultivo das larvas de Tcra); (5) C-LV (controle obtido por ruptura dos cistos na mesma proporção parasita/meio) e (6) LV-Tcra.

O resultado do SDS-PAGE mostrou que foram identificados proteínas <20 kDa nas 24 e 48 h de cultivo das larvas (Fig. 2, 1-2). O C-LV e LV-Tcra apresentaram-se mais complexos quanto à constituição de proteínas (Fig. 2, 5-6).

2.3 – PERFIL DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS ES-Tcra

A figura 3 representa o resultado do imunoblot utilizando antígenos ES24, ES48 e controle C-LV frente aos anticorpos policlonais dos soros de coelho anti-LV-Tcra e anti-Tso, e de soro e LCR de 5 pacientes com NC.

Fig. 3 - Imunoblot (SDS 15%) dos antígenos: (1) ES24; (2) ES48 e (3) C-LV com:

- (A) soro de coelho anti-LV-Tcra diluído 1:50;
- (B) soro de coelho anti-T-Tso diluído 1:80;
- (C) soro de paciente com NC diluído 1:50;
- (D a H) LCR de 5 pacientes com NC diluídos 1:5;
- (E e F) LCR de pacientes com parasitas em processo degenerativo;
- (G e H) LCR de pacientes em fase de calcificação;
- (E e G) LCR negativo para anticorpos.

Os resultados mostraram que anticorpos anti-Tcra e anti-Tso presentes nos soros imunes de coelho (Fig. 3, A-B) e anti-Tso em pacientes com NC (Fig. 3, C-H) identificaram as frações 20- e 14- kDa nos ES24, ES48 e C-LV e 30 kDa apenas no ES48 .

3 – PRODUÇÃO E ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS IgG EM BALB/c

Os animais imunizados com LV-Tcra apresentaram resposta para produção de IgG já no 19º dia, e foi o grupo que melhor respondeu para produção de IgG com reatividade tanto para o antígenos homólogo (Tcra) como para o heterólogo (Tso). Em segundo lugar vieram os animais imunizados com T-Tso, que mostraram uma reatividade menor no 19º dia, e os demais apenas após o “booster”.

Os resultados do imunoblot mostraram que com exceção dos animais imunizados com E-Tso, os demais apresentaram reatividade para as frações 18- e 14-12- kDa de Tcra e e 14-12 kDa de Tso. Outras frações também foram identificadas pelos anticorpos IgG produzidos nos animais.

4 – OBTENÇÃO DOS AcMo

A tabela 3 apresenta os hibridomas produzidos anti-Tcra e anti-Tso obtidos, a reatividade dos AcMo por ELISA e a especificidade por imunoblot utilizando antígeno LV-Tcra, LV-Tso, T-Tso e E-Tso.

Tabela 3: Anticorpos monoclonais anti-LV-Tcra, anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso obtidos, suas reatividades por ELISA com os respectivos antígenos e a especificidade por imunoblot utilizando antígeno Tcra e Tso.

AcMo obtidos		Reatividade (ELISA)				isótipo	imunoblot (kDa)	
		1	2	3	4		1	3
Anti-ES-Tcra	ES	+	+	+	-	IgG2b	18 e 14-12	14-12
Anti-LV-Tcra	LV	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
Anti-LV-Tso	A3	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	A5	-	+	-	-	IgG2b	-	14-12
	B6	+	+	-	-	IgG1	-	14-12
	C10	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	F11	-	+	-	-	IgG1	-	14-12
	F8F7	-	+	+	-	IgG1	-	14-12
	G3	-	+	-	-	IgG1	-	14-12
	G7	-	+	-	-	IgG1	-	14-12
	G9	-	+	+	-	IgG1	-	14-12
	G12F7	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
Anti-T-Tso	A5		+	+	-	IgG1	-	14-12
	A6	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	A10		+	+	-	IgG1	-	14-12
	B4	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	B11	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	E10	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	F5	-	+	+	-	IgG2b	-	14-12
	G8	-	+	+	-	IgG1	-	14-12
	H12	-	-	+	+	IgG1	-	14-12
Anti-E-Tso	B8	+	-	+	+	IgG1	-	45
	C11	-	+	+	+	IgG1	-	94, 75 e 45
	H9	-	-	-	+	IgG1	-	45

1: LV-Tcra; 2: LV-Tso; 3: T-Tso; 4: E-Tso

(+): com reatividade; (-): sem reatividade

Um total de 24 AcMo foram obtidos, 1 anti-LV-Tcra, 1 anti-ES-Tcra, 9 anti-T-Tso, 10 anti-T-Tso e 3 anti-E-Tso. Todos os AcMo foram testados quanto à reatividade por ELISA frente a todos os antígenos utilizados na imunização dos animais. Foi considerado como reativo o AcMo que apresentasse absorvância $\geq 0,500$, e no mínimo equivalente a 3X a absorvância do controle negativo.

O antígeno LV-Tcra foi reconhecido pelos 2 AcMo anti-Tcra, por 4 AcMo anti-LV-Tso, 4 AcMo anti-T-Tso e um AcMo anti-E-Tso no teste ELISA.

Os resultados mostraram que o antígeno LV-Tso foi reconhecido pela maioria dos AcMo exceto por um anti-T-Tso (H12) e dois anti-E-Tso (H9 e B8).

A preparação antigênica T-Tso foi reconhecida por AcMo anti-T-Tso, AcMo anti-Tcra, 2 AcMo anti-LV-Tso (F8F7 e G9) e 2 AcMo anti-E-Tso (B8 e C11).

O antígeno E-Tso foi reconhecido pelos AcMo anti-E-Tso e por um AcMo anti-T-Tso (H12).

Quanto a especificidade por imunoblot foi observado que as frações 18- e 14-12- kDa do LV-Tcra foram reconhecidas especificamente pelos AcMo anti-Tcra e cruzadamente por 3 anti-LV-Tso (C10, A3 e G12F7) e 4 anti-T-Tso (A6, B11, B4 e E10).

A fração 14-12 kDa do T-Tso foi identificada pelos AcMo anti-LV-Tso e anti-T-Tso e cruzadamente pelos anti-Tcra.

O peptídeo 45 kDa do antígeno T-Tso foi identificado pelos 3 AcMo anti-E-Tso, sendo que o B8 reconheceu também os de 75- e 94- kDa.

5 – EXPANSÃO DOS AcMo POR INDUÇÃO DE LÍQUIDO ASCÍTICO EM CAMUNDONGOS

Os hibridomas clonados foram expandidos com o propósito de congelar alíquotas de células para estoque, e também para obter quantidades de AcMo suficientes aos experimentos posteriores.

Para indução de líquido ascítico foram utilizados 10 animais para cada hibridoma, e a quantidade de ascite obtida por animal foi aproximadamente 2 mL.

Os resultados mostraram que as concentrações dos AcMo variaram entre 0,700 a 5,00 mg/mL.

6 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE AFINIDADE DO AcMo ANTI-ES-Tcra

6.1 – CURVA DE TITULAÇÃO DO AcMo ANTI-ES-Tcra

Na figura 4 estão os resultados do ELISA com AcMo anti-ES-Tcra em diferentes concentrações, frente ao antígeno LV-Tcra.

Fig. 4 - Absorbâncias resultantes do ELISA, utilizando AcMo anti-ES-Tcra em diferentes concentrações (diluições seriadas) frente ao antígeno LV-Tcra.

Com base na titulação foi escolhido na parte linear da curva, a concentração de 0,02 $\mu\text{g/mL}$ do AcMo anti-ES-Tcra, que corresponde a 50% da absorbância máxima observada.

6.2 – CÁLCULO DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO (K_d) DO AcMo ANTI-ES-Tcra

Na figura 5 estão os resultados da média das absorvâncias do ELISA utilizando sobrenadante da mistura entre o AcMo anti-ES-Tcra na concentração 0,02 $\mu\text{g/mL}$ e antígeno LV-Tcra em diferentes concentrações utilizado para sensibilizar a placa.

Fig. 5 - Absorvâncias resultantes do ELISA, utilizando sobrenadante da mistura entre AcMo anti-ES-Tcra na concentração 0,02 $\mu\text{g/mL}$ e antígeno LV-Tcra em diferentes concentrações. Placa sensibilizada com antígeno LV-Tcra.

A tabela 4 representa os valores das absorvâncias, concentração do AcMo anti-ES-Tcra e massa molecular (PM) utilizados para o cálculo da K_d .

Tabela 4. Resultados da concentração do AcMo anti-ES-Tcra com 50% de inibição, das absorvâncias do ELISA (com 0,02 $\mu\text{g/mL}$ de AcMo e com 50% da absorvância máxima) e o PM da fração de LV-Tcra.

valores utilizados para o cálculo da K_d			
Concentração do AcMo ES-Tcra	Absorvância do AcMo	Absorvância com 50% inibição	PM da fração de LV-Tcra
0,02 $\mu\text{g/mL}$	1,973	0,890	14 kDa

$$K_d = 1,15. 10^9 M$$

Os resultados indicaram que a constante de dissociação apresentou valor baixo, mostrando uma alta afinidade do anti-ES-Tcra para o LV-Tcra.

7 – ESPECIFICIDADE DE AcMo FRENTE A ANTÍGENOS DE Tcra, Tso E Tsag

A figura 6 apresenta os resultados da identificação de frações de Tcra, Tso e Tsag por AcMo (A) anti-LV-Tcra e (B) anti-ES-Tcra.

Fig. 6 - Imunoblot (SDS: 5-20%) dos AcMo (A) anti-LV-Tcra e (B) anti-ES-Tcra com os antígenos: (1) LV-Tcra; (2) LV-Tso; (3) M-Tso; (4) E-Tso; (5) T-Tso; (6) EM-Tsag e (7) T-Tsag.

Em todos os antígenos (Tcra, Tso e Tsag) foram identificadas frações <20 kDa pelos AcMo anti-LV-Tcra (Fig. 6, A) e anti-ES-Tcra (Fig. 6, B).

8 - UTILIZAÇÃO DOS AcMo

Os AcMo anti-cisticercos foram utilizados na purificação de antígeno LV-Tcra, T-Tso e LCR de pacientes com NC por cromatografia de afinidade, na caracterização imunoquímica do LV-Tcra, na pesquisa de anticorpos anti-Tso e antígeno de Tso em amostras de pacientes com NC.

8.1 - PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO LV-Tcra COM AcMo ANTI-Tcra

O antígeno LV-Tcra foi purificado em colunas de afinidade preparadas com AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra. O volume aplicado foi de 10 mL de LV-Tcra com concentração de 1,4 mg/mL (proteína total, 14,0 mg).

As concentrações protéicas das frações purificadas foram dosadas por LOWRY (LOWRY et al., 1951), e os valores obtidos foram 900 µg/mL e 1000 µg/mL quando purificado com os AcMo anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra, respectivamente. O volume final das frações, após concentração foi 6 mL, e o total de proteínas obtidas foi 5,4 mg para o purificado com AcMo anti-LV-Tcra e 6,0 mg quando utilizado AcMo anti-ES-Tcra, correspondente a um rendimento de 38,5 e 43%, respectivamente.

8.1.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES PURIFICADAS DE LV-Tcra POR SDS-PAGE

A figura 7 mostra o resultado do SDS-PAGE corado pelo Coomassie blue do antígeno LV-Tcra (1) antes e após a purificação com AcMo (2) anti-LV-Tcra e (3) anti-ES-Tcra.

Fig. 7 - SDS-PAGE (15%) do antígeno LV-Tcra corado pelo Coomassie blue (1) antes e após a purificação com AcMo (2) anti-LV-Tcra e (3) anti-ES-Tcra.

Os resultados mostraram que as proteínas purificadas por imunoafinidade (anti-LV e anti-ES) são frações com massa molecular de 18- e 14-12- kDa (Fig. 7, 2-3). Alguns resíduos de proteínas de aproximadamente 67 kDa, também foram identificados.

8.1.2 – ESPECIFICIDADE DE AcMo ANTI-Tcra E ANTI-Tso POR ANTÍGENOS DE Tcra PURIFICADO, LV-Tcra E ANTÍGENO DE Tso

Foram selecionados alguns AcMo com ou sem reatividade com LV-Tcra para fazer um estudo de reatividade utilizando antígenos LV-Tcra, LV-Tcra purificado com AcMo anti-ES-Tcra, LV-Tso, T-Tso e E-Tso.

Na figura 8 estão apresentados os resultados da identificação de frações de Tcra e Tso utilizando AcMo anti-Tcra e anti-Tso, por imunoblot.

Fig. 8 - Imunoblot (SDS: 5-20%) com AcMo: (1) controle do conjugado, (2) AcMo anti-ES-Tcra, (3) A3 (anti-LV-Tso), (4) B11 (anti-T-Tso), (5) G9 (anti-LV-Tso), (6) F8F7 (anti-LV-Tso), (7) H12 (anti-T-Tso), (8) B8 e (9) C11 (estes 2 são anti-E-Tso), frente a antígenos (A) LV-Tcra, (B) LV-Tcra purificado, (C) LV-Tso, (D) T-Tso e (E) E-Tso.

Os AcMo anti-ES-Tcra, A3 e B11 apresentaram reatividade com as frações 18- e 14-12- kDa de Tcra (Fig. 8A e B, 2-4). Os AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) identificaram o 14-12 kDa dos antígenos LV-Tso, T-Tso e E-Tso (Fig. 8C, D e E, 2-7). Os AcMo anti-E-Tso reconheceram a banda de 45 kDa dos antígenos LV-Tso, T-Tso e E-Tso, sendo que o B8 reconheceu as bandas com cerca de 75- e 94- kDa também (Fig. 8D e E, 8-9). O peptídeo 45 kDa do LV-Tso foi reconhecido pelos AcMo anti-E-Tso (Fig. 8C, 8-9).

8.1.3 – PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR E SORO DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO COM AcMo

As frações purificadas do antígeno LV-Tcra foram utilizadas na pesquisa de anticorpos anti-Tso em LCR e soro de pacientes com NC por imunoblot e dot-ELISA.

8.1.3.1 - PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR E SORO DE PACIENTES COM NC POR IMUNOBLOT UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO COM AcMo ANTI-LV-Tcra

A figura 9 mostra o resultado do imunoblot utilizando (A) soros negativo e positivo e (B) LCR negativo e positivo de pacientes com NC, utilizando antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra.

Fig. 9 - Imunoblot (SDS: 15%) de LCR e soro de pacientes com NC: (A, 1-2) soro negativo e (A, 3-4) soro positivo; (1-B) controle do conjugado; (B, 2-3) LCR negativo; (B, 4-6) LCR positivo de pacientes com NC, frente a antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra.

Anticorpos presentes nas amostras de soro (Fig. 9A, 3-4) e LCR (Fig. 9B, 4-6) de pacientes com NC identificaram as frações 18- (apenas soro) e 14-12-kDa de Tcra (soro e LCR).

8.1.3.2 - PESQUISA DE ANTICORPOS EM LCR E SORO DE PACIENTES COM NC POR DOT-ELISA UTILIZANDO LV-Tcra PURIFICADO COM AcMo ANTI-LV-Tcra

A figura 10 mostra o resultado do dot-ELISA utilizando (2-7) LCR negativo e positivo e (8-12) soros negativo e positivo de pacientes com NC, utilizando antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra.

Fig. 10 - dot-ELISA com LCR e soro de pacientes com NC, utilizando antígeno LV-Tcra purificado com AcMo anti-LV-Tcra: (1) controle do conjugado; (2-3) LCR negativo; (4-7) LCR positivo; (8) soro negativo e (9-12) soros positivo.

Os resultados mostraram que apenas houve precipitação do cromógeno (*dots*) nas amostras de LCR (Fig. 10, 4-7) e soros (Fig. 10, 9-12) de pacientes com NC.

8.2 – PESQUISA DE ANTICORPOS POR ELISA COMPETIÇÃO EM LCR DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO ANTÍGENOS DE Tcra E Tso

A figura 11 representa os resultados do ELISA competição de AcMo anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) com anticorpo presente em LCR de pacientes com NC pelos antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

Fig. 11 - Absorbâncias resultantes do ELISA competitivo. (1) Apenas LCR; (2) LCR e AcMo anti-ES-Tcra; (3) LCR e AcMo anti-LV-Tcra; (4) LCR e AcMo anti-LV-Tso/A3 e (5) LCR e AcMo anti-T-Tso/B11, utilizando antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

As análises mostraram que os AcMo competem com anticorpos anti-Tso em LCR pelos antígenos ES-Tcra, LV-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

Na tabela 5 estão relatadas as diferentes misturas feitas com AcMo e LCR utilizadas no ELISA de competição.

Tabela 5. Códigos (letras) correspondentes a cada mistura de AcMo anti-ES-Tcra (ES), anti-LV-Tso (A3), anti-T-Tso (B11) e anti-E-Tso (B8) juntamente com LCR utilizados no ELISA competição.

Misturas de AcMo com LCR					
A	ES + LCR	E	ES/A3 + LCR	I	A3/B8 + LCR
B	A3 + LCR	F	ES/B11 + LCR	J	B11/B8 + LCR
C	B11 + LCR	G	ES/B8 + LCR	L	ES/A3/B11/B8 + LCR
D	B8 + LCR	H	A3/B11 + LCR		

Na figura 12 estão os resultados da competição de AcMo anti-Tcra e anti-Tso em diferentes misturas com anticorpo presente em LCR de pacientes com NC pelos dos antígenos LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

Fig. 12 - Absorbâncias resultantes do ELISA competitivo dos AcMo anti-ES-Tcra (ES), anti-LV-Tcra (LV), anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) com anticorpo anti-Tso em LCR por antígeno LV-Tcra, ES-Tcra, LV-Tso e T-Tso.

A incubação com misturas entre diferentes AcMo juntamente com o LCR foi feita para analisar se esses AcMo realmente competem pelo mesmo epítopo presente nos antígenos de Tcra e Tso. Os resultados mostraram que as absorbância não alteraram significativamente após a execução de tal procedimento, confirmando mais uma vez que a especificidade parece ser a mesma.

8.3 – AVALIAÇÃO IMUNOQUÍMICA DO ANTÍGENO LV-Tcra UTILIZANDO AcMo

O antígeno LV-Tcra foi tratado de diferentes maneiras com o propósito de melhor estudá-lo quanto à sua composição açúcar e proteína, e a importância desses constituintes na especificidade de AcMo anti-Tcra e anti-Tso.

Antes da execução do ELISA, o antígeno LV-Tcra foi tratado por aquecimento a 100°C por 15 minutos, ou com NaBH₄, TCA e ácido periódico.

8.3.1 – REATIVIDADE POR ELISA DOS AcMo FRENTE AO ANTÍGENO LV-Tcra NATIVO OU TRATADO POR AQUECIMENTO, NaBH_4 , TCA E ÁCIDO PERIÓDICO

Na figura 13 estão os resultados do ELISA com AcMo anti-Tcra e anti-Tso utilizando antígeno LV-Tcra sem tratamento, com aquecimento (100°C , 15 min), tratado com NaBH_4 , TCA e ácido periódico (H_5IO_6).

Fig. 13 - Absorbâncias resultantes do ELISA, utilizando AcMo anti-Tcra (anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra), anti-LV-Tso (A3) e anti-T-Tso (B11) com antígeno LV-Tcra sem e com aquecimento, sem e com tratamento por NaBH_4 , TCA e ácido periódico.

Os resultados mostraram que o aquecimento e o tratamento com NaBH_4 do LV-Tcra não afetaram a reatividade dos AcMo, no entanto após os tratamentos com TCA e ácido periódico houve redução total da reatividade.

8.3.2 – ESPECIFICIDADE POR IMUNOBLOT DOS AcMo FRENTE AO ANTÍGENO LV-Tcra NATIVO OU TRATADO POR TCA, NaBH₄ E ÁCIDO PERIÓDICO

Foi feito imunoblot para verificar quais as frações do LV-Tcra foram responsáveis pela alteração na reatividade dos AcMo após os tratamentos.

A figura 14 apresenta os resultados da identificação de frações do antígeno LV-Tcra sem ou com tratamento por NaBH₄, TCA e ácido periódico pelos AcMo (A) anti-ES-Tcra, (B) anti-LV-Tcra, (C) anti-LV-Tso e (D) anti-T-Tso.

Fig. 14 - Imunoblot (SDS: 15%) dos AcMo (A) anti-ES-Tcra, (B) anti-LV-Tcra, (C) anti-LV-Tso/A3 e (D) anti-T-Tso/B11: (1), (3) e (5) LV-Tcra sem tratamento; (2) tratado com NaBH₄, (4) TCA e (6) ácido periódico.

As análises mostraram que a reatividade dos AcMo pelas frações <20 kDa de LV-Tcra não foi alterada após tratamento com NaBH₄ (Fig. 14, 2), no entanto houve redução total da reatividade após os tratamentos com TCA e ácido periódico (Fig. 14, 4 e 6).

8.4 – PESQUISA DE ANTÍGENO EM LCR DE PACIENTES COM NC POR ELISA E IMUNOBLOT UTILIZANDO AcMo ANTI-Tcra

O AcMo anti-ES-Tcra foi utilizado na pesquisa de antígeno em LCR de pacientes com NC por ELISA. A pesquisa de antígeno foi feita também por imunoblot utilizando AcMo anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra.

8.4.1 - PESQUISA DE ANTÍGENO EM LCR DE PACIENTES COM NC POR ELISA UTILIZANDO AcMo ANTI-ES-Tcra

A tabela 6 representa os resultados do ELISA com AcMo anti-ES-Tcra e LCR de paciente com NC.

Tabela 6. Resultados do ELISA de LCR (1-17) de pacientes com NC e (18-20) controle negativo utilizando AcMo anti-ES-Tcra.

Absorbância (DO) do ELISA com LCR de pacientes com NC e controle utilizando AcMo anti-ES-Tcra							
LCR	DO	LCR	DO	LCR	DO	LCR	DO
1	2,433	6	0,580	11	0,625	16	0,512
2	0,703	7	0,836	12	0,709	17	1,281
3	0,626	8	1,141	13	0,515	18	0,196
4	0,546	9	0,976	14	1,196	19	0,250
5	0,864	10	0,784	15	0,560	20	0,155

8.4.2 - PESQUISA DE ANTÍGENO EM LCR DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO AcMo ANTI-ES-Tcra POR IMUNOBLOT

Na figura 15 estão apresentados os resultados da identificação de frações de antígenos de cisticercos em amostras de LCR de pacientes com NC, positivas no teste ELISA para detecção de antígenos utilizando AcMo anti-ES-Tcra.

Fig. 15 – Imunoblot (SDS: 15%) com amostras de LCR: (1-17) LCR de pacientes com NC, (18-20) controle negativo e (21) ES48, utilizando AcMo anti-ES-Tcra.

As 17 amostras de pacientes com NC foram positivas por ELISA e os controles negativos não apresentaram reatividade (tabela 6). A absorbância média das amostras positivas foi 2X a média do controle, com absorbância acima de 0,500.

Os resultados mostraram que os LCR de pacientes com NC apresentaram reatividade para as frações 30-, 18- e 14-12- kDa (Fig. 15, 1-17). Todos os LCR de pacientes com NC foram positivos para 14-12 kDa, 6 para 18 kDa e 10 para 30 kDa. Nenhuma reatividade foi observada com o LCR controle (Fig 15, 18-20). Os AcMo reconheceram as frações 30-, 18- e 14-12- kDa do ES48 de Tcra (Fig. 15, 21).

8.4.3 - PESQUISA DE ANTÍGENO EM LCR DE PACIENTES COM NC UTILIZANDO AcMo ANTI-LV-Tcra POR IMUNOBLOT

A figura 16 apresenta os resultados da identificação de frações de antígenos de cisticercos em amostras de LCR de pacientes com NC utilizando AcMo anti-LV-Tcra.

Fig. 16 - Imunoblot (SDS: 15%) com amostras de LCR: (1-4) LCR de pacientes com NC e (5-7) controle negativo, utilizando AcMo anti-LV-Tcra.

Os resultados mostraram que os LCR de pacientes com NC apresentaram reatividade para as frações 30-, 18-, 14-12- kDa (Fig. 16, 1-4). Nenhuma reatividade foi observada com o LCR controle (Fig. 16, 5-7).

9 – SEQÜENCIAMENTO DOS ANTÍGENOS DE Tcra E Tso

Foram selecionadas as frações 18- e 14-12- kDa do LV-Tcra nativo, 14-12 kDa de LV-Tcra e 18- e 14-12- kDa de T-Tso purificados com AcMo anti-Tcra para seqüenciar o NH₂ terminal.

A tabela 7 apresenta os resultados dos seqüenciamentos (NH₂ terminal) dos antígenos de Tcra e Tso. Estão expressos também resultados de seqüenciamentos de proteínas de Tcra obtidos por ZARLENGA et al. (1994) e FISCHER et al. (1994), assim como de Tso obtido por CHUNG et al. (1999).

Tabela 7. Resultados dos seqüenciamentos das frações 18- e 14-12- kDa de LV-Tcra nativo, 14-12 kDa de Tcra e 18- e 14-12- kDa de Tso purificados, e de Tcra e Tso seqüenciados por outros autores.

Seqüenciamento de porções NH ₂ terminal														
		A	P	T	D	D	K	R	V	I	D	L	K	
V	A	A	P	T	D	D	K	G	P	E	D	L	K	K
V	A	A	P	T	D	D	K	G	P	E	D	L	K	K
V	A	A	P	D	D	D	K	G	Q	E	D	L	N	M
		A	P	S	S	S	T	G	T	E	S	L	I	
		V	P	A	S	S	X	G	T	E	S	L	I	

NMT: N- glicosilação

* Peptídeo recombinante

Quanto aos resultados dos seqüenciamentos das frações de Tcra, as análises mostraram que as frações 18- e 14-12- kDa de Tcra purificados ou não apresentam seqüências bastante similares entre si, que estão representadas pela seqüência A, P, T, D, D, K, R, V, I, D, L e K.

Os seqüenciamentos dos antígenos de Tso não mostraram homologia com o antígeno de Tcra (tabela 7). O antígeno de Tcra mostrou uma certa homologia com os de Tcra obtidos por ZARLENGA e col. e de FISCHER e col., assim como de Tso obtido por CHUNG e col. (tabela 7).

Um "pool" de LCR de pacientes com NC foi purificado com AcMo anti-ES-Tcra para efetuar o seqüenciamento de antígenos de Tso presentes nessas amostras, no entanto a quantidade de proteínas não foi suficiente para processar o seqüenciamento do NH₂ terminal.

DISCUSSÃO

O diagnóstico clínico da NC é considerado difícil pela grande variedade de sinais e sintomas comuns a outras patologias. Por outro lado, os exames de imagem são inacessíveis pelo alto custo. Os testes laboratoriais para detecção de anticorpos e antígenos representam a melhor opção para auxílio diagnóstico.

Uma alternativa encontrada para melhorar a qualidade dos testes imunológicos é a obtenção de antígenos específicos e imunodominantes, que favoreçam a redução de resultados falso-positivos e falso-negativos. A procura incessante dessas frações pela difícil obtenção, torna a padronização dos imunoensaios um desafio contínuo. Uma das abordagens feitas na cisticercose tem sido a utilização de proteínas de baixa massa molecular aplicada com sucesso no diagnóstico (TSANG et al., 1989; BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2001).

Antes de selecionar as mais importantes frações para produzir um teste, há necessidade de obter o antígeno de forma bruta. A dificuldade em obter suínos naturalmente infectados com larvas de *T. solium*, assim como sua difícil manipulação, por se tratar de um animal de médio porte, não encoraja a utilização desse modelo de obtenção de parasitas. Além disso, a dificuldade em extrair as vesículas pela sua forte fixação aos tecidos do suíno, favorece o rompimento das larvas no momento da manipulação, causando perda do material, principalmente do líquido vesicular, que é rico em proteína de baixa massa molecular, consideradas imunodominantes (KUNZ et al., 1989; BUENO et al., 2000). Essa difícil retirada das vesículas também favorece a contaminação do material com proteínas de tecido animal, levando a obtenção de antígenos não muito adequados, especialmente para testes

imunoenzimáticos em amostras de suínos. Tais obstáculos estimularam os pesquisadores na busca de fontes alternativas de parasitas (LARRALDE et al, 1990, VAZ et al., 1997 a).

Estudos de reatividade cruzada entre os cestódeos (*T. solium* e *T. crassiceps*) demonstraram a possibilidade da utilização de antígeno obtido de cisticercos de *T. crassiceps* no diagnóstico da cisticercose humana e suína (BUENO et al., 1999; PINTO et al., 2000). As larvas de *T. crassiceps* são mantidas em camundongos pela inoculação de pequenas vesículas no peritônio de BALB/c fêmeas, modelo alternativo experimental, tomando possível sua utilização nos estudos da cisticercose (PARKHOUSE & HARRISON, 1987; KUNZ et al., 1989; LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997 a e b; BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2002; BRAGAZZA et al., 2002).

Os resultados apresentados neste trabalho como forma de contribuição para o diagnóstico da cisticercose foram obtidos utilizando antígeno de *T. crassiceps*, juntamente com preparações antigênicas obtidas de *T. solium* e de *T. saginata* para realizar estudos comparativos das reatividades entre as espécies, utilizando anticorpos monoclonais e amostras humanas de pacientes e soros imunes de animais.

CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE Tcra, Tso E Tsag

O rendimento do antígeno LV-Tcra (128 mg de antígeno) foi considerado ótimo quando comparado aos antígenos Tso e Tsag obtidos a partir de algumas centenas de parasitas retirados de tecidos de suíno e bovino com cisticercose de *T. solium* e *T. saginata*, respectivamente (tabela 1). O baixo rendimento dos antígenos Tso e Tsag é devido a dificuldade em se ter tecidos com larvas e a difícil extração dos cistos fortemente fixados aos músculos. Essas causas tem sido citadas como as responsáveis pelo baixo rendimento protéico e não reprodutibilidade dos lotes desse tipo de antígenos (SAKO et al., 2000).

Os antígenos obtidos neste trabalho apresentaram uma composição complexa que envolve algumas dezenas de peptídeos (Fig. 1). Os antígenos de líquido vesicular mostram diferenças quando comparados com o total e de escólex. O antígeno LV-Tcra apresentou uma maior concentração de peptídeos de massa molecular abaixo de 20 KDa (Fig. 1, 1), considerados imunodominantes também por outros autores (BUENO, 1999; KUNZ et al., 1989). O antígeno LV-Tso também se mostrou constituído de grande quantidade de frações <20 kDa (Fig. 1, 2), e apesar da maior dificuldade de sua obtenção, tem sido utilizado no diagnóstico da NC (YANG et al., 1998). O padrão de peptídeos dos antígenos T-Tso e E-Tso foi ainda mais heterogêneo (Fig. 1, 3-4), e apresentou várias frações protéicas distribuídas entre 94- e 10-kDa. A menor quantidade de frações de baixa massa molecular nos antígenos T-Tso e T-Tsag, provavelmente é consequência da perda do líquido vesicular durante a extração dos parasitas. A complexidade que ocorre pela presença de proteínas de membrana e escólex no antígeno T-Tso vem sendo relatada também por outros autores (GROGL et al., 1985; GOTTSTEIN et al., 1986; VAZ, 1993). O antígeno T-Tsag (Fig. 1, 5) também apresentou composição heterogênea e complexa de peptídeos, confirmando observações de outros autores (PARKHOUSE e HARRISON, 1987).

ANTÍGENO DE EXCREÇÃO E SECREÇÃO DE Tcra (ES-Tcra)

Durante o período de cultura das larvas (144 h), foram obtidas novas vesículas de *T. crassiceps* por brotamento, e mais de metade das larvas apresentaram sinais de degeneração (opacidade) ao final do sexto dia. A inoculação em camundongos de 15 larvas, obtidas após o cultivo e sem sinais de opacidade, mostrou viabilidade parasitária pela reprodução com obtenção de cerca de 900 cisticercos após 60 dias. A capacidade de regeneração de larvas de *T. crassiceps* a partir de membrana de células obtidas após o cultivo do parasita em meio de cultura tem sido mostrada (TOLEDO et al., 1997). Ao

contrário, HUSTEAD & WILLIAMS, 1977, relataram a manutenção de vesículas viáveis por duas semanas de cultura, sem observar sinais de degeneração, possivelmente pelo uso de meio mais enriquecido, favorecendo o prolongado período de viabilidade dos cistos. Nos estudos aqui realizados foi utilizado um meio pobre em nutrientes para evitar interferências na análise da composição dos componentes dos antígenos ES. Em experimentos anteriores, havíamos tentado utilizar RPMI enriquecido com nutrientes (L-glutamina, piruvato e aminoácidos não-essenciais) e soro fetal, com excelente manutenção do parasita. Entretanto não houve condições de diferenciar os peptídeos ES dos demais na mistura do meio de cultura, pela complexidade da quantidade de peptídeos apresentados após a coloração pela prata (dados não apresentados). De fato, para a manutenção da cepa por longo período de tempo, como por exemplo, para transporte ou envio para outros pesquisadores, o meio utilizado é RPMI com nutrientes e soro fetal.

A caracterização dos antígenos ES-Tcra por SDS-PAGE e coloração pela prata mostrou peptídeos <20 kDa já nas primeiras 24 h de manutenção. A quantidade desses peptídeos aumentou até 48 h, não tendo sido possível identificar nos dias seguintes (Fig. 2). A maior produção observada nas 48 h coincidiu com o dia em que houve maior número de larvas viáveis, e também com a maior concentração protéica, ou seja, 5,4 mg ou 5,2 µg por cisticerco (tabela 2). A partir do segundo dia, os parasitas começaram a degenerar e, portanto, a não mais secretar o antígeno. O antígeno ES-Tcra mostrou menor complexidade antigênica comparando com o extrato total e o LV-Tcra (VAZ et al., 1997 a; BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000 b).

A análise dos resultados mostrou que o antígeno obtido no segundo dia parece ser realmente ES, pois as larvas neste período se mostraram intactas, sem sinais de degeneração, além do que o padrão de peptídeos observado no antígeno C-LV, obtido com mesmo número de larvas rompidas, mostrou-se mais complexo no SDS-PAGE (Fig. 2, 5).

Outros autores têm utilizado a abordagem de cultivo de parasitas para estudo de antígenos de excreção e secreção. WILKINS et al. (1999) mantiveram ovos de *T. solium* por duas semanas em meio de cultura MEM e identificaram os peptídeos 32,7- e 37,8- kDa no 15º dia, caracterizados como antígenos ES produzidos continuamente pelo verme. KO & NG, 1998 identificaram os peptídeos 43-, 58- e 66- kDa como antígenos ES de larvas de *T. solium* mantidas por 3 dias em meio 199, e detectados por anticorpos de soro de suínos com cisticercose, reagindo cruzadamente com soro anti-larvas de *T. hydatigena*. D'SOUZA & HAFEEZ, 1999, não observaram essa reatividade cruzada com antígenos ES de larvas de *T. solium*, mantidas em meio RPMI por uma semana.

Analisando o imunoblot, foi observado que anticorpos anti-Tcra e anti-Tso presentes em soros imunes de coelho e anticorpos anti-Tso de soro e LCR de pacientes com NC identificaram os peptídeos 20- e 14- kDa nos antígenos ES24 e ES48 e controle C-LV (Fig. 3). Um peptídeo adicional de 30 kDa foi identificado apenas no antígeno ES48, sugerindo que esse componente seja exclusivamente excretado/secretado pelo parasita. Desta forma, acredita-se que os antígenos ES produzidos pelo parasita sejam reconhecidos desde o início da infecção, induzindo a produção de anticorpos, e justificando a elevada imunogenicidade já relatada (BUENO et al., 2000; ESPÍNDOLA et al., 2000 a) e que foi confirmada neste trabalho.

Em dois LCR de pacientes com NC, que apresentaram teste negativo para pesquisa de anticorpos utilizando antígeno Tso, também não foram detectados anticorpos utilizando antígeno ES (Fig. 3E e G). Era esperado que os antígenos ES, por serem produzidos precocemente, fossem também mais precocemente reconhecidos que os antígenos de membrana e escólex. É possível que tenha havido produção de anticorpos anti-ES em pequena quantidade, ou que esses anticorpos tenham sido complexados com os antígenos ES secretado para o LCR, de forma que ambos não foram detectados. Essa hipótese não pode ser descartada, uma vez que SCIUTTO et

al. (1998), observaram que antígenos ES e anticorpos específicos para essas frações foram detectados em suínos com infecção experimental com ovos de *T. solium*, com pico máximo 92 dias após ingestão, havendo declínio de ambos ao final de 200 dias após a infecção, provavelmente em consequência da formação de imunocomplexos. De toda forma, um maior número de amostras de LCR, de pacientes em diferentes fases evolutivas da infecção, poderá elucidar melhor essa questão.

PRODUÇÃO DE AcMo

Todos os antígenos utilizados na imunização de camundongos foram considerados com imunogenicidade suficiente para obtenção de linfócitos secretores de anticorpos necessários à fusão celular. O LV-Tcra foi o antígeno que apresentou maior imunogenicidade na produção de anticorpos IgG com reação específica com antígenos Tcra e cruzada com Tso. A grande quantidade de peptídeos de baixa massa molecular que constitui o antígeno, correspondente a cerca de 50% do total do conteúdo do LV-Tcra (BUENO, 1999), já havia mostrado excelente imunogenicidade (ESPINDOLA et al., 1999, 2000 a). Com exceção dos anticorpos IgG anti-E-Tso, com reatividade predominante para frações com massa igual e acima de 45 kDa, os demais anticorpos reconheceram os peptídeos 18- e 14-12- kDa de Tcra e 14-12 kDa de Tso. Em estudo anterior havíamos constatado a reatividade de IgG anti-Tcra e anti-Tso com peptídeos <30 kDa de Tso e Tcra (ESPINDOLA et al., 1999).

Ao contrário do observado por outros pesquisadores (NASCIMENTO et al., 1995), o antígeno E-Tso não foi considerado um bom imunógeno, pois mesmo após o "booster", a reatividade específica para E-Tso não foi intensa.

Um dado interessante foi a observação de uma maior reatividade dos anticorpos anti-Tso pelo antígeno LV-Tcra no imunoblot do que no ELISA. De fato, o LV-Tcra apresenta grande quantidade de frações <30 kDa altamente

reativas para amostras de pacientes com NC (BUENO et al., 2000, PARDINI, et al., 2001; BRAGAZZA et al., 2002).

A obtenção dos dois AcMo anti-Tcra (anti-LV e anti-ES), 3 anti-LV-Tso (C10, A3 e G12F7) e 4 anti-T-Tso (A6, B11, B4 e E10), com reatividade para os mesmos peptídeos (18- e 14-12- kDa de Tcra e 14-12 kDa de Tso) confirma mais uma vez que os antígenos utilizados na imunização partilham frações em comum. Inclusive a aplicação do AcMo anti-ES-Tcra para pesquisa de antígenos no diagnóstico na cisticercose foi publicado por nossa equipe (ESPÍNDOLA et al., 2002), e um maior número de amostras está sendo ensaiado para melhor avaliação do teste (dados não apresentados).

Os demais AcMo anti-LV-Tso e anti-T-Tso apresentaram reatividade apenas com o 14-12 kDa de T-Tso (tabela 3), indicando que esses AcMo foram produzidos contra outros epítomos que também estão presentes na fração de baixa massa molecular de Tso, no entanto em menor concentração no LV-Tcra. Também é possível que sejam epítomos comuns ao LV-Tcra mas não acessíveis na membrana de nitrocelulose, não permitindo a identificação das frações 18- e 14-12- kDa de Tcra. O antígeno E-Tso que apresentou baixa imunogenicidade na produção de anticorpos em camundongos deu origem a AcMo com reatividade para as frações 94-, 75- e 45- kDa de T-Tso (tabela 3). Com certeza, a predominância de frações de maior massa molecular e a reduzida quantidade de peptídeos <30 kDa no antígeno E-Tso (Fig. 1, 4) levou à produção de AcMo com essa especificidade.

Além da reatividade com antígenos Tcra e Tso, os AcMo anti-Tcra também apresentaram especificidade para frações <20 kDa do antígeno total de cisticercos de *T. saginata* (Fig. 6). Esses resultados vêm de encontro com outros publicados sobre a produção de AcMo anti-Tso com reatividade para antígenos Tsag (CORREA et al., 1989 a e b; RODRIGUEZ-DEL-ROSAL et al., 1989), confirmando a presença de peptídeos comuns entre essas espécies.

UTILIZAÇÃO DOS AcMo

Purificação por Imunoafinidade do Antígeno LV-Tcra

Os diferentes testes laboratoriais para o diagnóstico da NC têm combinado sensibilidade e especificidade de formas bem variadas, e a dificuldade em diferenciar as espécies, pelas frações antigênicas em comum, contribui para a ineficiência de um ensaio, principalmente no que se diz respeito à especificidade.

A purificação em coluna de imunoafinidade do antígeno LV-Tcra e a caracterização das frações antigênicas envolvidas na reatividade dos anticorpos tiveram como propósito buscar alternativas para melhorar os ensaios laboratoriais aplicados ao diagnóstico da cisticercose, visando determinar as frações antigênicas responsáveis pela sensibilidade e especificidade do teste.

A purificação do LV-Tcra resultou em um rendimento de 38,5% e 43% do total do antígeno quando utilizados AcMo anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra, respectivamente. Consideramos um excelente rendimento, além do método ser simples rápido e barato, o que não é o caso do método de purificação por afinidade com lectinas (GREENE et al., 1999 e 2000). O bom rendimento, favorecido pela fácil disponibilidade de cisticercos de Tcra, não é encontrado quando são utilizados cistos de *T. solium* para obtenção do líquido vesicular (SAKO et al., 2000).

As frações purificadas do LV-Tcra corresponderam aos peptídeos 67-, 18- e 14-12- kDa (Fig. 7, 2-3), e no imunoblot, a reatividade dos AcMo anti-Tcra e anti-Tso e de anticorpos presentes em soro e LCR de humanos com NC foi para os peptídeos 18- e 14-12- kDa purificados (Fig. 8B e Fig. 9), semelhante ao relatado para as frações de 18- e 14- kDa de Tso obtidas em colunas de sepharose-lentil-lectina (GREENE et al., 1999).

A análise de maior número de amostras de LCR e soro utilizando as frações purificadas de 18- e 14-12- kDa de Tcra, pode confirmar a maior

especificidade desse antígeno, principalmente porque as frações >30 kDa de antígenos Tcra têm sido indicadas como responsáveis pela reação cruzada com outras parasitoses (BRAGAZZA et al., 2002). A única fração >30 kDa identificada no SDS-PAGE foi a 67 kDa, não apresentando reatividade com os anticorpos (Fig. 9). Provavelmente essa fração é um artefato desprendido da coluna, como relatado por KIM et al. (1986), que também obtiveram uma fração eluída da coluna durante a purificação de antígenos Tso com AcMo anti-Tso, sem reatividade com anticorpos em amostra de pacientes com NC, considerando-a também artefato. Embora não se descarte a possibilidade de ser resíduos de imunoglobulina da coluna, o ensaio imunoblot com conjugado anti-imunoglobulina de camundongo não mostrou reatividade (Fig. 8).

A tentativa de adsorção dessas frações purificadas às placas de poliestireno tem sido frustrada, por isso fez-se a opção em utilizar como fase sólida membranas de nitrocelulose ou PVDF. O *dot*-ELISA pode ser uma boa opção nos casos em que não são disponibilizados aparelhos de eletroforese no laboratório, além de ser uma técnica mais barata e rápida, quando comparada com imunoblot. Os resultados do *dot*-ELISA mostraram reatividade apenas com soro e LCR de pacientes NC (Fig. 10), com perspectivas de um número maior de amostras serem avaliadas em novos ensaios.

Uma proposta futura é a melhoria do diagnóstico da cisticercose suína, já que o exame *post-mortem* não apresenta a sensibilidade desejada e o teste ELISA com antígeno LV-Tcra também mostra reatividade não desejada (PINTO, 1999). A aplicação de frações antigênicas de cisticercos de *T. crassiceps* (de reatividade comum aos cisticercos de *T. solium*) purificadas por imunoafinidade com anticorpos monoclonais pode representar opção para incrementar os ensaios diagnósticos em amostras de soro de suínos.

Além da utilização das frações purificadas de Tcra como forma de eliminar os problemas das reações inespecíficas ou cruzadas, também foi feito ensaio competitivo para esta abordagem. Foram feitos testes de competição por ELISA com quatro AcMo que apresentaram reatividade com Tcra e Tso (anti-

ES-Tcra, anti-LV-Tcra, A3/anti-LVTso e B11/anti-T-Tso) (Fig. 11), e foi observado que os AcMo competem com anticorpos anti-Tso em LCR de pacientes com NC pelos antígenos ES-Tcra, LV-Tcra, LV-Tso e T-Tso. Mesmo aumentando a concentração dos AcMo, não ocorreu um aumento da quantidade de AcMo que se ligaram aos antígenos, de modo a reduzir mais a leitura. Provavelmente isso acontece por existirem no LCR anticorpos anti-Tso com diferentes especificidades para os diferentes epítomos, incluindo os de reação cruzada com os AcMo estudados. Acredita-se que primeiramente os AcMo ocupam os peptídeos, impedindo que os policlonais se liguem, de tal forma que uma determinada quantidade de AcMo seria suficiente para ocupar todos os epítomos específicos. Os outros peptídeos, com reatividade apenas com o policlonal do LCR, são os responsáveis pela formação do complexo antígeno-anticorpo e conjugado, com conseqüente leitura. Estes resultados são interessantes para auxiliar na padronização de testes para detecção de anticorpos em amostras de pacientes com NC, objetivando o aumento da especificidade, especialmente em amostras de soro. Uma abordagem seria fazer o *dot*-ELISA com as frações purificadas para então poder avaliar melhor a competição.

Com o propósito de melhor esclarecer a especificidade dos AcMo no ensaio competitivo, foi feito ELISA com misturas desses diferentes AcMo juntamente com o LCR. Pretendíamos esclarecer se os AcMo competem pelo mesmo epítomo presente nos antígenos Tcra e Tso. Os resultados mostraram que não houve competição significativa diferente entre a incubação dos AcMo individualmente ou na mistura (Fig. 12), sugerindo que os anticorpos estejam reconhecendo o mesmo epítomo, ou que tenha havido impedimento estérico a partir da ligação de um deles ao epítomo. A inclusão de um AcMo anti-E-Tso (B8) de reatividade com peptídeos 45-, 75- e 94- kDa de E-Tso foi feita para avaliar se este anticorpo não competiria com os outros AcMo pelo mesmo epítomo, e como era esperado, não foi observada essa competição. Estudos utilizando a fração Fab da molécula de IgG, obtida por digestão com papaína,

por exemplo, poderiam elucidar melhor o reconhecimento do mesmo epítipo pelos anticorpos (FRIGUET et al., 1983).

Uma excelente maneira de avaliar a eficiência de frações antigênicas para um ensaio é a caracterização dos epítopos reativos. É importante determinar a composição de preparações antigênicas específicas ao diagnóstico, para saber o que faz delas mais eficientes que outras, principalmente qual a diferença dessas com as responsáveis pela reação cruzada. Os AcMo representam excelentes ferramentas para esta abordagem. Nos ensaios de caracterização do antígeno LV-Tcra utilizando AcMo anti-Tcra e anti-Tso, a reatividade do teste ELISA foi totalmente reduzida quando o antígeno LV-Tcra foi tratado com TCA ou periodato, mas não houve alteração após aquecimento e tratamento com borohidreto (Fig. 13). O imunoblot confirmou que esses epítopos fazem parte das frações 18- e 14-12- kDa (Fig. 14). Isso mostra que porções de proteínas ligadas a açúcares, ou seja, glicoproteínas 18- e 14-12- kDa têm participação fundamental na antigenicidade, e os testes com periodato e TCA provaram isto. Outros autores usando periodato mostraram que peptídeos de 18-, 16- e 12- kDa de cisticercos de Tso, também glicoproteínas, foram importantes na antigenicidade para detecção de anticorpos em soro de pacientes com NC (OBREGÓN-HENAO et al., 2001).

Ao contrário dos nossos resultados, a reatividade de dois AcMo anti-Tsag com antígeno de Tsag foi reduzida após o tratamento com borihidreto e se manteve após o tratamento com TCA, periodato e aquecimento (DRAELANTS et al., 1995 a). Também HARRISON et al. (1989), obtiveram resultados opostos aos nossos com AcMo anti-Tsag e antígeno de Tsag tratado com periodato e TCA.

Os diferentes tratamentos do antígeno LV-Tcra mostraram que os epítopos reativos do antígeno não são porções açúcares com ligação do tipo O-carbohidratos, uma vez que o borihidreto quebra esse tipo de ligação. Tudo indica que as frações do antígeno LV-Tcra possuem carbohidratos constituídos

de 2 grupos hidroxila ou 1 grupo hidroxila com um grupo amino adjacente, pois o ácido periódico oxida esses grupos adjacentes, levando à quebra das ligações carbono-carbono (JACKSON & HUDSON, 1953).

O reconhecimento de duas ou mais frações pelo mesmo AcMo é justificado por possuir nas diferentes frações o mesmo epítipo reativo. As glicoproteínas 18- e 14-12- kDa por nós purificadas e as presentes no LV-Tcra sem tratamento foram reconhecidas pelo mesmo tipo de AcMo, mostrando que possuem homologia entre si. Homologia entre as duas glicoproteínas 18- e 14- kDa de Tso também foi observada por GREENE et al. (1999). Pode ser que as condições redutoras a que as frações do antígeno são submetidas para o SDS-PAGE tenham alterado a preparação antigênica de modo a acelerar ou retardar o deslocamento no gel. Não se pode descartar a possibilidade dos peptídeos de baixa massa molecular serem componentes de frações maiores, como relatado para as glicoproteínas 18- e 14- kDa de Tso, resultantes de tratamento sob condições redutoras com dithiothreitol das glicoproteínas 20- e 50- kDa (GREENE et al., 1999). Também o número de resíduos de açúcar das frações pode levar a diferenças de massa molecular, como observado para as glicoproteínas 18-, 16- e 12- kDa de Tso (OBREGÓN-HENAO et al., 2001).

Deteccção de Antígeno em LCR de Pacientes Com NC

A maioria dos testes laboratoriais para o diagnóstico da NC é baseada na detecção de anticorpos, no entanto os testes têm o inconveniente de na maioria das vezes não detectarem a infecção precoce, além de não distinguir a infecção curada devido à possibilidade dos anticorpos ficarem na circulação por muito tempo. A detecção de antígenos em amostras de pacientes com NC seria uma opção para essas situações, ajudando desta forma a esclarecer o diagnóstico, bem como mais um marcador de acompanhamento terapêutico ou da história natural da cisticercose.

Os AcMo anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra, por terem sido eficientes na caracterização de antígenos de Tcra e Tso e na purificação de antígeno de LV-Tcra, foram selecionados para a pesquisa de antígenos em amostras de pacientes com NC. Outro fator relevante para a escolha deste AcMo anti-ES-Tcra foi seu elevado índice de afinidade (tabela 4) e certamente o fato de ter sido produzido contra frações excretadas pelo parasita.

O AcMo anti-ES-Tcra mostrou-se muito eficiente na detecção de antígenos em LCR de pacientes com NC por ELISA (tabela 6). No imunoblot, utilizando os AcMo anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra, essa reatividade foi caracterizada como específica para os peptídeos 30-, 18- e 14-12- kDa, sendo o peptídeo 14 kDa detectado em 100% dessas amostras (Fig. 15 e 16). O AcMo anti-ES-Tcra se mostrou uma excelente ferramenta na pesquisa de ES em LCR de pacientes com NC (ESPÍNDOLA et al., 2002), assim como os AcMo anti-ES-Tsag foram eficientes na detecção de ES em soro de pacientes com NC (BRANDT et al., 1992).

Outros pesquisadores também aproveitaram a reatividade cruzada entre os cisticercos para detectar antígeno em soro de humanos e suínos com cisticercose utilizando AcMo anti-Tsag (BRANDT et al., 1992).

AcMo anti-Tso também foi utilizado na pesquisa de antígeno em soro e LCR de pacientes com NC (CORREA et al., 1989 b; CHANG-YUAN et al., 1992), e AcMo anti-Tsag na pesquisa de antígeno ES em soro de gado infectado com cisticercose por Tsag (HARRISON et al., 1989).

Nossa pretensão futura é utilizar os AcMo aqui obtidos não só na pesquisa de antígenos em um maior número de amostras de soro e LCR de pacientes, como também em soro de suínos com cisticercose. A padronização de ensaios com amostras de suínos tem como propósito incrementar os ensaios de diagnóstico da cisticercose suína.

Outra contribuição que os AcMo podem representar é no acompanhamento terapêutico anti-helmíntico ou na diferenciação das fases da

doença, como vem sendo proposto (GARCIA et al., 2000; NGUEKAM et al., 2003).

SEQÜENCIAMENTO NH₂ TERMINAL

O seqüenciamento das frações 18- e 14-12- kDa de LV-Tcra, 14-12 kDa do ES-Tcra e 14-12 kDa de Tcra purificada por imunoafinidade confirmou a homologia parcial existente entre as frações (tabela 7), indicando também que o antígeno ES-Tcra, produto de secreção e excreção das larvas, faz parte da composição do líquido vesicular do parasito (ESPÍNDOLA et al., 2002).

Já havíamos levantado duas hipóteses para os diferentes posicionamentos no SDS-PAGE das frações 18- e 14-12- kDa de Tcra homólogas, tratamento redutor e índice de N-glicosilação. Ao contrário do esperado e relatado por CHUNG et al. (1999) para o peptídeo 10 kDa de Tso, o seqüenciamento não evidenciou a presença de sítios de N-glicosilação nas frações aqui analisadas (tabela 7).

As frações 18- e 14-12- kDa de Tcra apresentaram um certo grau de homologia com os peptídeos 118- e 132- kDa de Tcra seqüenciados por FISCHER et al. (1994), bem com o peptídeo 45 kDa de Tcra seqüenciado por ZARLENGA et al. (1994) (tabela 7). As reações cruzadas observadas entre os antígenos Tcra e Tso nos ensaios aqui feitos, sugere uma certa homologia entre as duas fontes de cisticercos, que não foi evidenciada no seqüenciamento NH₂ terminal aqui realizado (tabela 7). Outros estudos de seqüenciamento merecem ser feitos, mesmo porque as frações de Tcra aqui analisadas apresentaram homologia parcial com o peptídeo 10 kDa de Tso, obtido por DNA-recombinante a partir de "primer" de cisticercos de *T. crassiceps* (ZARLENGA et al., 1994; CHUNG et al., 1999).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que AcMo constituem importantes ferramentas para darmos continuidade ao estudo de antígenos,

resposta imune, diagnóstico e elucidação de fenômenos imunobiológicos da complexa relação parasita-hospedeiro na cisticercose.

CONCLUSÕES

- Antígenos ES-Tcra obtidos após 24 e 48h de cultivo foram reconhecidos por anticorpos presentes em soro de coelhos imunizados com antígenos de Tcra e Tso e anticorpos presentes em soro e LCR de pacientes com NC, e foram caracterizados como frações de 18- e 14-12-kDa.
- Antígenos de Tcra e Tso foram utilizados para obtenção de vários anticorpos monoclonais, que reconheceram a fração 18- e/ou 14-12-kDa, exceto o AcMo anti-E-Tso que reagiu com frações ≥ 45 kDa de Tso.
- Frações <30 kDa de Tcra foram purificadas com anticorpos monoclonais anti-Tcra e mostraram-se eficientes na pesquisa de anticorpos em amostras de pacientes com NC;
- Os anticorpos monoclonais anti-Tcra e anti-Tso foram eficazes na pesquisa de anticorpos em LCR de pacientes com NC por ELISA competitivo;
- A caracterização do LV-Tcra tratado por aquecimento, com TCA, boridreto de sódio e periodato de sódio mostrou que o antígeno é constituído de glicoproteínas fundamentais na especificidade dos anticorpos monoclonais anti-Tcra e anti-Tso;
- A aplicação de anticorpos monoclonais anti-Tcra na pesquisa de antígenos em LCR de pacientes com NC foi bem sucedida, mostrando reatividade para peptídeos <30 kDa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BENDELL, J. C., DOMCHEK, S M., BURSTEIN, H. J., HARRIS, L., YOUNGER, J., KUTER, B. C., RUE, M., GELMAN, R., WINER, E. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. *Cancer*, Nancy, v.15, n.97, p.2972-2977, 2003.
- BRAGAZZA, L. M., VAZ, A. J., PASSOS, A. D. C., TAKAYANAGUI, M., NAKAMURA, P. M., ESPÍNDOLA, N. M., PARDINI, A. X. AND BUENO, E. C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v.44, n.4, p.7-12, 2002.

De acordo com a norma NBR6023/00 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

- 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 da Universidade de São Paulo).
- BUENO, E. C., VAZ, A. J., MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., MIELLE, S. R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.38, n.1, p.146-151, 2000.
- CAMPBELL, P., MARCUS, R. Monoclonal antibody therapy for lymphoma. *Blood Rev.*, New York, v.17, n.3, p.143-152, 2003.
- 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.
- 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.
- CHUNG, J., BAHK, Y. Y., HUH, S., KANG, S. Y., KONG, Y., S. A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. *J. Infect. Dis.*, Chicago, n. v. 180, p.1307-1315, 1999.

- 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, 1989 (a).
- 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, 1989 (b).
- D'SOUZA, P. E., HAFEEZ, M. D. Detection of *Taenia solium* cysticercosis in pigs by ELISA with an excretory-secretory antigen. *Vet. Res. Communi.*, Dordrecht, v. 23, n. 5, p.293-298, 1999.
- DRAELANTS, E., BRANDT, J. R. A., KUMAR, V., GEERTS, S. Characterization of epitopes on excretory-secretory antigens of *Taenia saginata* metacetodes recognized by monoclonal antibodies with immunodiagnostic potential. *Parasite Immunol.*, Oxford, V. 17, p.119-126, 1995 (a).
- 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 (b).
- ESPÍNDOLA, N.M. - *T. solium* e *T. crassiceps*: caracterização de antígenos e obtenção de anticorpos monoclonais. São Paulo, 1999 (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

- ESPÍNDOLA, N. M., DE GASPARI, E. N., NAKAMURA, P. M., VAZ, A. J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 89, p.321-326, 2000 (a).
- ESPÍNDOLA, N. M., DE GASPARI, E. N., NAKAMURA, P. M., VAZ, A. J. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v. 42, p.175-177, 2000 (b).
- ESPÍNDOLA, N. M., VAZ, A. J., PARDINI, FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.96, n.4, p.361-368, 2002.
- 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.
- 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.

- FLISSER, A., PÉREZ-MONTFORT, R., LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. *Bull. WHO*, v.57, n.5, p.839-856, 1979.
- FLISSER, A., WOODHOUSE, E., LARRALDE, C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.39, p.27-37, 1980.
- FREEMAN, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. *Can. J. Zoo.*, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.
- FRIGUET, B., DJAVADI-OHANIAN, L., PAGES, J., BUSSARD, A., GOLDBERG, M. A. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the β_2 -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.60, p.351-358, 1983.
- FRIGUET, B., CHAFFOTTE, A. F., DJAVADI-OHANIAN, L., GOLDBERG, M. A. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.60, p.305-319, 1985.
- GARCIA, H. H., GILMAN, R. H.W., CATAROCA, M., VERASTEGUI, M., GONZALEZ, A. E., TSANG, V. C. W. Serological evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v.175, p.486-489, 1997.

- GARCIA, H. H., PARKHOUSE, R. M. E., GILMAN, R. H., MONTENEGRO, T., BERNAL, T., MARTINEZ, S. M., GONZALEZ, A. E., TSANG, V. C. W., HARRISON, L. J. S. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v.94, p.673-676, 2000.
- 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.
- GREENE, R. M., WILKINS, P. P., TSANG, V. C. W. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v.99, p.257-261, 1999.
- GREENE, R. M., HANCOCK, K., WILKINS, P. P., TSANG, V. C. W. *Taenia solium*: molecular cloning serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.6, p.1001-1007, 2000.
- GROGL, M., ESTRADA, J. J., MACDONALD, G., KUHN, R. E. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J. Parasit.*, Lawrence, v.71, n.4, p.433-442, 1985.
- HARLOW, E., LANE, D. Antibodies. A laboratory manual. 2.ed. USA: 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., SUMMER, 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, p462-470, 1991.
- HAYUNGA, E. G., SUMMER, M. P. Isolation and purification of a diagnostic antigen for bovine cysticercosis by hydrophobic chromatography. *Vet. Immunol. Pathol.*, Amsterdam, v. 28, p.57-65, 1991.
- HUSTEAD, S. T., WILLIAMS, J. F. Permeability studies on taeniid metacestodes: I. uptake of proteins by larval stages of *Taenia taeniaeformis*, *T. crassiceps*, and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.63, p. 314-321, 1977.
- JACKSON, E. L., HUDSON, C. L. 7-deoxyl-L-manno-L-galo-heptose and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.75, p.3000-3002, 1953.
- JANEWAY Jr., C. A., TRAVERS, P. **Imunobiologia: O sistema imunológico na saúde e na doença**, 2. Ed, Porto Alegre: artes médicas, 1997.
- 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.
- KIM, S., KANG, S., CHO, S. Purification of cystic fluid *Taenia solium* using monoclonal antibody and its antigenic characterization. *Korean J. Parasitol.*, Korea, v.24, p.145-158, 1986.
- KO, R. C., NG, T. F. Evaluation of excretory/secretory products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cysticercosis. *J. Helminthol.*, London, V.72, p.147-154, 1998.

- KÖHLER, G. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Nobel Lectures*, p.120-129, 1984.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, London, v.256, p.495-497, 1975.
- 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. Bakteriol.*, Stuttgart, v.271, p.510-520, 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.
- 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.
- LIU, D., LIGHTOWLERS, M. W., RICKARD, M. D. Evaluation of a monoclonal antibody-based competition ELISA for the diagnosis of human hydatidosis. *Parasitol.*, 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. Contribuição de reação de imunofluorescência no líquido cefalorraquiano ao estudo da neurocisticercose. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.39, p.261-278, 1981.

- LIVRAMENTO, J. A., MACHADO, L. R., SPINA-FRANÇA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: FERJERMAN, 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.
- MACHADO, L. R. Líquido cefalorraqueano e neurocisticercose. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.45, n.4, p.353-363, 1987.
- MACHADO, A. B. B., PIALARISSI, C. S. M., VAZ, A. J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral, São Paulo, SP (Brasil). *Rev. Saude Publ.*, São Paulo, v.22, n.3, p.240-244, 1988.
- 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.
- McMICHAEL, A. J., FABER, J. W. **Monoclonal antibodies in clinical medicine**. London: Academic Press Inc, 1982, 663p.
- MINER, K. M., SKELLY, R. R., HAYES, E. C., GAMMON, M. T., MANYAK, C. L. Monoclonal antibodies – importance of the laboratory animal. In: JR. MELBY, E. C., BALK, M. W. **The importance of laboratory animal genetics, health, and the environment in biomedical research**, London: Academic press, inc., 1983. Part IV, 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.
- MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cysticercoses. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, Rio de Janeiro, v.3, p.320-327, 1911.
- NAKAHARA, H., SONG, J., SUGIMOTO, M., HAGIHARA, K., KISHOMOTO, T., YOSHIZ, N. N. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, n.6, p.1521-1529, 2003.
- NASCIMENTO, E., WAVRINK, W. Avaliação de antígenos de *Cysticercus cellulosae* para imunodiagnóstico da cisticercose humana pela hemaglutinação indireta. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, São Paulo, v.26, p.289-294, 1984.
- NASCIMENTO, E., TAVARES, C. A. P., LOPES, J. D. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.25, n.7, p.1182-1185, 1987.

- NASCIMENTO, E., COSTA, J. O., GUIMARÃES, C. A. P., TAVARES, C. A. P. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Pathol.*, Amsterdam, v.45, p.127-137, 1995.
- NGUEKAM, Z. A. p., ONGOLO-ZOGO, P., DORNY, P., BRANDT, J., GEERTS, S. Follow-up of neurocysticercosis patients after treatment using antigen detection ELISA. *Parasit.*, Lawrence, v.10, n.1, p.65-68, 2003.
- NIETO, C. Cysticercosis of the central nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. *Neurology*, Minneapolis, v.6, p.725, 1956.
- OBREGÓN-HENAO, A., GIL, D. L., GÓMEZ, D. I., SANZÓN, F., TEALE, J. M., RESTREPO, B. I. The role of N-linked carbohydrates in the *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 14, and 18kD. *Mol. Biochim. Parasitol.*, Amsterdam, v. 144, p.209-215, 2001.
- PAMMENTER, M. D., ROSSOUW, E. J. The value of an antigenic fraction of *Cysticercus cellulosae* in the serodiagnosis of cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, London, v.81, n.2, p.117-123, 1987.
- PARDINI, A. X., VAZ, A. J., MACHADO, L. R. AND LIVRAMENTO, J. A. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 39, p.3368-3372, 2001.

- PARDINI, A. X., PERALTA, R. H., VAZ, A. J., MACHADO, L. R., PERALTA, J. M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v.9, n.1, p.190-193, 2002.
- 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.
- PINTO, P. S. A. – Diagnóstico imunológico da cisticercose suína como contribuição à inspeção de carnes. São Paulo, 1999 (Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 1999).
- PINTO, P. S. A., VAZ, A. J., GERMANO, P. M. L., NAKAMURA, P. M. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v. 88, p.127-130, 2000.
- 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.
- RESTREPO, B. I., OBREGÓN-HENAO, A., MESA, M., GIL, D. L., ORTIZ, B. L., MEJÍA, J. S., VILLOTA, G. E., SANZÓN, F. TEALE, J. M. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Inter. J. Parasitol.*, Lawrence, v.30, p.689-696, 2000.
- RHOADS, M. L., MURREL, K. D., DILLING, G. W., WONG, M. M. BAKER, N. F. A potential diagnostic reagent for bovine cysticercosis. *J. Parasit.*, Lawrence, v.71, n.6, p.779-787, 1985.

- RODRIGUEZ-DEL-ROSAL, E., CORREA, D., FLISSER, A. Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum. *Vet. Record.*, London, v.124, p.488, 1989.
- SAKO, Y., NAKAO, M., IKEJIMA, T., PIAO, X. Z., NAKAYA, K., ITO, A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J. Clin. Microbiol.* Washington, v.38, n.12, p.4439-4444, 2000.
- SANCHEZ, M. C. A. Testes sorológicos. Em: FERREIRA, A. W., ÁVILA, S. L. **M. Diagnóstico das principais doenças infecciosas e auto-imunes**, 2. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, R. J., 2001.
- SCIUTTO, E., ALUJA, A., FRAGOSO, G., RODARTE, L. F., HERNÁNDEZ, M., VILLALOBOS, M. N., PADILLA, A., KEILBACH, N., BACA, M., GOVEZENSKY, T., DÍAZ, S., LARRALDE, C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.60, p.53-67, 1995.
- SCIUTTO, E., HERNÁNDEZ, M., GARCÍA, G., ALUJA, A. S., VILLALOBOS, A. N. M., RODARTE, L. F., PARKHOUSE, M. AND HARRISON, L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.*, Amsterdam, v.78, p.185-194, 1998.
- SECHER, D. S. Monoclonal antibodies by cell fusion. *Immunol. Today*, Barking, p.22-26, 1980.
- 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-FRANÇA, A. Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. *Rev. Paul. Med.*, São Paulo, v.48, p.59-70, 1956.
- SPINA-FRANÇA, A. Síndrome líquórica da Neurocisticercose. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.19, p.287, 1961.
- SPINA-FRANÇA, A., REZENDE, G. L.. Alteraciones del líquido cefalorraquídeo con el praziquantel. *Sal. Pub. Mex.*, México, v.24, p. 633-636, 1982.
- SPINA-FRANÇA, A. Imunobiologia da cisticercose: avaliação dos conceitos atuais. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v. 27, n.2, p126-140, 1984.
- 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.
- TAKAYANAGUI, O. M., JARDIM, E. Aspectos clínicos da neurocisticercose. Análise de 500 casos. *Arq. Neuropsiquiatr.*, São Paulo, v.41, n.1, p.50-63, 1983.
- TELLEZ-GIRON, E., RAMOS, M. C., DUFOUR, L., ALVAREZ, P., MONTANTE, M. Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and standard ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v.37, p.169-173, 1987.
- 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.

- TOLEDO, A., CRUZ, C., FRAGOSO, G., LACLETTE, J. P., MERCHANT, M. T., HERNÁNDEZ, M. AND SCIUTTO, E. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.83, n.2, p.189-193, 1997.
- TOWBIN, H., GORDON, J. Immunoblotting and dot immunoblotting - current status and outlook. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.72, p.313-340, 1984.
- 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.
- 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. Lat-amer. Microbiol.*, México, 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 da Universidade de São Paulo).
- 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. Immunoth. Infec. Dis.*, Chicago, 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).
- WILKINS, P. P., ALLAN, J. C., VERASTEGUI, M., ACOSTA, M., EASON, A. G., GARCIA, H. H., GONZALEZ, A. E., GILMAN, R. H. AND TSANG, V. C. W. Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, V.60, n.2, p.199-204, 1999.
- ZACCAGNA, A., BERTONE, A., PUIATTI, P., PICCIOTTO, F., SPRUJEVNIK, T., SANTUCC, R. F. P. Anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody (infliximab) for the treatment of pyoderma gangrenosum associated with Crohn's disease. *Eur. J. Dermatol.*, Montrouge, v.13, n.3, p.258-60, 2003.
- ZARLENGA, D. S., RHOADS, M. L., AL-YAMAN, F. M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Mol. Bioch. Parasitol.*, Amsterdam, v.67, p.215-223, 1994.
- 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 a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol.*, Oxford, v.20, p.483-488, 1998.

LIV.	200405 do Auto
N. E.	
DATA	23/03/04
PREC	
TOMBA	16104104

2:17851

~ BIBLIOTECA ~
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

Data:	23/03/04
Lilacs:	OK
Dedalus:	1379449
MFN:	26464
Terminal:	OK