

ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS EM EXTRATOS AQUOSOS DE LARVAS E ADULTOS DE *T. SOLIUM*

II — RELACIONAMENTO ANTIGÊNICO, PADRÕES CROMATOGRÁFICOS; ATIVIDADE IMUNOLÓGICA DO ESCÓLEX

E. NASCIMENTO (1) e F. G. ARAÚJO (1)

RESUMO

No relacionamento antigênico entre reações homólogas AgLI-ALI (Ag=antígeno, A=anticorpo, LI=líquido), AgME-AME (ME=membrana), AgES-AES (ES=escólex), AgCC-ACC (CC= *Cysticercus cellulosae* total ou larva de *T. solium*) e o antígeno solúvel de adultos de *Taenia solium* (AgTS) foram observadas respectivamente 4, 4, 7 e 5 linhas de precipitação, das quais 2, 3, 7 e 3 apresentaram identidades totais e 2, 1, 0 e 2 linhas com ausência de identidade na dupla difusão. Não foi observada identidade parcial. Quando usou-se AgTS-ATS frente aos antígenos CC, LI, ME e ES foram observadas respectivamente 6, 4, 5 e 3 linhas de precipitação, sendo que 2, 2, 4 e 1 apresentaram identidades totais, 4, 1, 1 e 1 com identidades parciais e 0, 1, 0 e 1 com ausência de identidades na dupla difusão. O antígeno ES foi o que detectou menor número de linhas de precipitação comuns às da *T. solium* adulta. Os picos II e III do antígeno ES foram os mais sensíveis para detectar anticorpos anti-larva, no teste de hemaglutinação indireta.

INTRODUÇÃO

A complexidade antigênica do cisticerco foi relatada pelo estudo do escólex, membrana e líquido da vesícula do *Cysticercus bovis* e de vermes adultos por MACHNICKA⁶. Seis linhas de precipitação foram observadas quando o soro anti-verme adulto foi testado contra o extrato de escólex e membrana e quatro linhas quando o mesmo soro foi testado contra o líquido da vesícula na dupla difusão em gel de ágar. NASCIMENTO & ARAÚJO⁴, estudando os componentes antigênicos e o relacionamento entre os antígenos de *Cysticercus cellulosae* total, líquido, membrana e escólex evidenciaram a importância das partes do cisticerco pela sua imunogenicidade, concluindo ser o antígeno de escólex o mais importante da larva, por ser mais imunogênico e por apresentar identidade imunoló-

gica com os componentes antigênicos do líquido e da membrana na dupla difusão.

As pesquisas até então realizadas no sentido de se obter um antígeno mais sensível não tiveram como objetivo evidenciar antígenos comuns entre as fases de desenvolvimento da *Taenia solium*. Tal problema tem em nosso meio grande importância pela quantidade enorme de pessoas com teníase, podendo então ocorrer reações cruzadas, dificultando assim o diagnóstico seguro da cisticercose humana.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o relacionamento entre os antígenos da *Taenia solium* adulta e da larva; os padrões cromatográficos dos antígenos de escólex, membrana, líquido e *Taenia solium* adulta e deter-

(1) Trabalho realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), no Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486, 30.000 — Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

minar a atividade imunológica do antígeno de escólex pela hemaglutinação indireta.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos

Taenia solium — as *T. solium* foram obtidas de pacientes naturalmente infectados e tratados com Niclosamida (Yomesan, Bayer) ⁵. O extrato foi obtido usando a mesma metodologia descrita por NASCIMENTO & ARAUJO ⁴. O extrato foi denominado TS.

Cysticercus cellulosae total, Líquido, Escólex e Membrana: os cisticercos integros obtidos de carcaças de suínos eram dissecados em líquido, escólex e membrana com auxílio de bisturi e microscópios estereoscópicos. O processo de extração usado foi o mesmo descrito por NASCIMENTO & ARAUJO ⁴, sendo denominado CC, LI, ES e ME, respectivamente.

Dupla difusão — utilizamos a metodologia descrita por NASCIMENTO & ARAUJO ⁴.

Cromatografia por troca iônica — na cromatografia foi usado o DEAE-celulose (CARL SCHLEICHER & SCHULELL CO. 2609 STANDARD). O preparo do DEAE foi feito de acordo com STANWORTH ⁶. Foram utilizadas colunas de vidro com 8,0 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro. As colunas foram montadas com 2,0 gramas de resina equilibrada com tampão fosfato 0,01M, pH8,0. O fluxo utilizado foi de 28ml por hora, usando o fracionador Gilson (LKB). Quinze miligramas de proteínas do antígeno dializado contra o tampão inicial foram aplicadas à coluna. Frações de 3,0 ml foram automaticamente coletados através de trocas sucessivas de tampões (stepwise), usando inicialmente o tampão fosfato 0,01M, pH8,0. Manteve-se a mesma molaridade de fosfato para os tampões subsequentes acrescida de NaCl a 0,25M, 0,50M, 0,75M e 1,0M. O volume de exclusão da coluna ("void") foi em torno de 20,0 ml e para cada pico que saia, a coluna era lavada com mais 70,0 ml do mesmo tampão, antes de se colocar o subsequente.

Hemaglutinação indireta — foi realizada segundo BOYDEN ¹ e STAVITSKY ⁷, adaptada ao nosso sistema com a realização da técnica em "Microtiter" (NASCIMENTO & ARAUJO) ⁴. A leitura foi feita após duas horas à temperatura ambiente.

RESULTADOS

As reações entre os antígenos CC, LI, ME, ES e seus imunes soros frente aos antígenos TS estão mostradas na Fig. 1 e Tabela I.

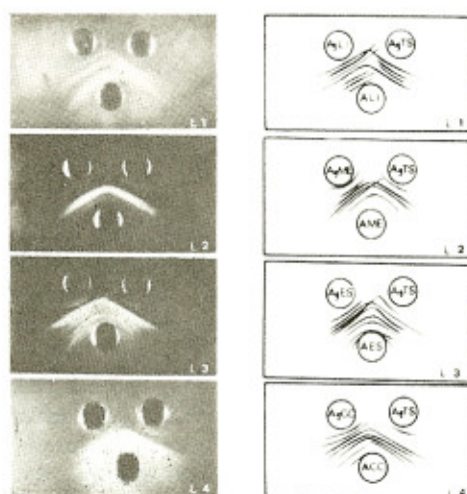


Fig. 1 — Dupla difusão e diagramas mostrando as linhas de precipitação entre os antígenos de líquido (AgLI Ag = antígeno), membrana (AgME), escólex (AgES), *Cysticercus cellulosae* total (AgCC) e seus imunes soros homólogos ALI, AME, AES e ACC (A = anticorpo) em relação ao antígeno de *Taenia solium* (AgTS)

O relacionamento antigênico entre TS e seu imune soro homólogo frente aos demais antígenos do *C. cellulosae* estão representados na Fig. 2 e Tabela II.

Os padrões cromatográficos dos antígenos LI, ME, ES e TS representados na Fig. 3, mostram-nos o alto poder de separação das proteínas dos antígenos pelo DEAE-celulose.

O poder antigênico dos picos obtidos no fracionamento do antígeno ES estão representados na Fig. 4.

DISCUSSÃO

Nas reações entre imune soro anti-LI, anti-ME, anti-ES e anti-CC e o antígeno TS (Fig. 1 e Tabela I), foram evidenciadas respectivamente 4, 4, 7 e 5 linhas de precipitação, sendo observado 2, 1, 0 e 2 linhas com ausência de identidade, revelando assim a presença de antígenos diferentes entre as partes do cisticerco, e da *Taenia solium* enquanto que as linhas res-

T A B E L A I

(*) Reações de dupla difusão em gel de ágar entre os antígenos CC, LI, ME, ES e seus imunes soros homólogos em relação ao antígeno TS

Lâminas	N.º de linhas obtidas nas reações específicas	Antígeno TS comparado frente ao imune soro	N.º de linhas obtidas	Identicidades antigênicas		
				Total	Parcial	Ausência
L ₁	AgLI-anti-LI 7	anti-LI TS	4	2	—	2
L ₂	AgME-anti-ME 6	anti-ME TS	4	3	—	1
L ₃	AgES-anti-ES 8	anti-ES TS	7	7	—	—
L ₄	AgCC-anti-CC 7	anti-CC TS	5	3	—	2

(*) Resumo da Fig. 1

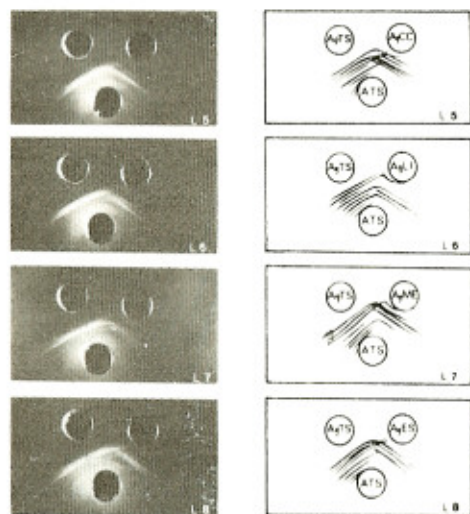


Fig. 2 — Dupla difusão e diagramas mostrando as linhas de precipitação entre o antígeno de *Taenia solium* (AgTS Ag = antígeno) e seu imune soro homólogo (ATS A = anticorpo) em relação aos antígenos de *Cysticercus cellulosae* total (AgCC), líquido (AgLI), membrana (AgME) e escólex (AgTS)

tantes, incluindo as do antígeno ES comportaram como identicidades sorológicas, não sendo observada identidade parcial. Tais dados excluem a possibilidade do uso de antígenos da *Taenia solium* adulta para detectar anticorpos anti-cisticercos, pela sua inespecificidade.

No relacionamento entre os antígenos do *C. cellulosae* e da *T. solium* (Fig. 2 e Tabela II), podemos observar que o imune soro anti-TS detectou 6 e 5 componentes antigênicos do CC e da ME, dos quais 2 e 4 apresentavam identicidades, 4 e 1 linhas com identidade parcial respectivamente. O LI apresentou 4 linhas de precipitação, das quais 2 com identidade total 1 parcial e outra com ausência de identidade. No antígeno ES foram detectados apenas 3 componentes antigênicos, sendo que cada componente apresentou identidade total, parcial e uma linha com ausência de identidade. Este foi o antígeno que apresentou menor número de componentes antigênicos comuns aos do verme adulto. Esse experimento demonstra a existência de reações cruzadas entre antígenos de

T A B E L A II

(*) Reações de dupla difusão entre o antígeno TS e imune soro homólogo em relação aos antígenos CC, ME e ES

Lâminas	N.º de linhas obtidas na reação específica AgTS Ac-anti-TS	Antígenos comparados frente ao imune soro anti-TS	N.º de linhas	Identicidades antigênicas		
				Total	Parcial	Ausência
L ₅	8	CC	6	2	4	—
L ₆	8	LI	4	2	1	1
L ₇	8	ME	5	4	1	—
L ₈	8	ES	3	1	1	1

(*) Fig. 2

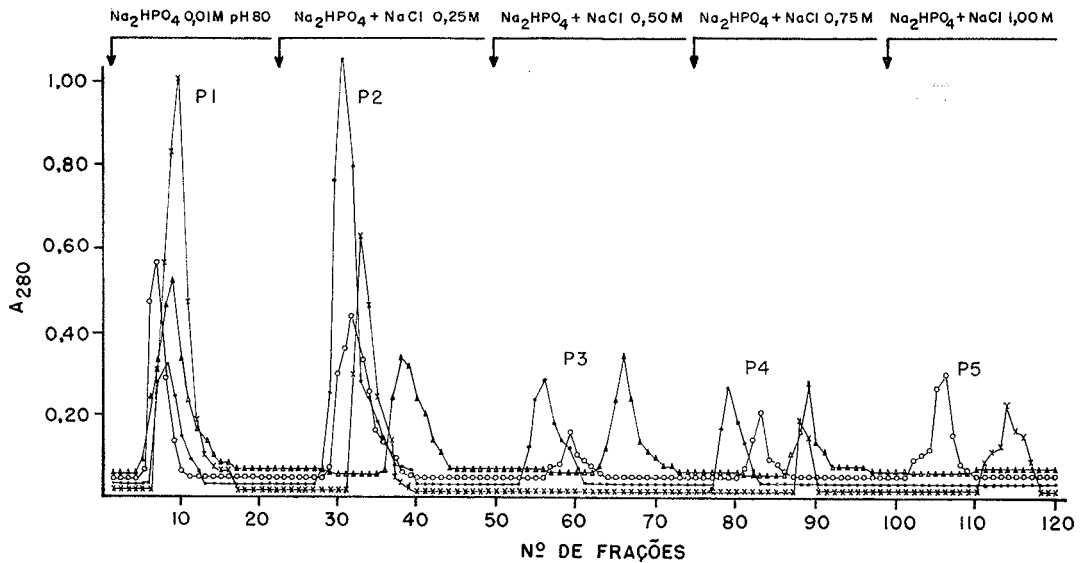


Fig. 3 — Padrões-cromatográficos dos antígenos de líquido (LI x-x), membrana (ME ▲-▲), escólex (ES ○-○) e *Taenia solium* (TS ●-●) em DEAE-celulose. Aplicaram-se 3,0 ml de cada antígeno contendo 15,0 mg de proteínas dializadas contra tampão fosfato 0,01 M pH8,0 em colunas de DEAE-celulose de 8,0 x 2,0 cm previamente equilibradas com o mesmo tampão. Em seguida procedeu-se às eluições utilizando-se os tampões assinalados na figura, com fluxo de 28,0 ml por hora. Foram coletadas frações de 3,0 ml.

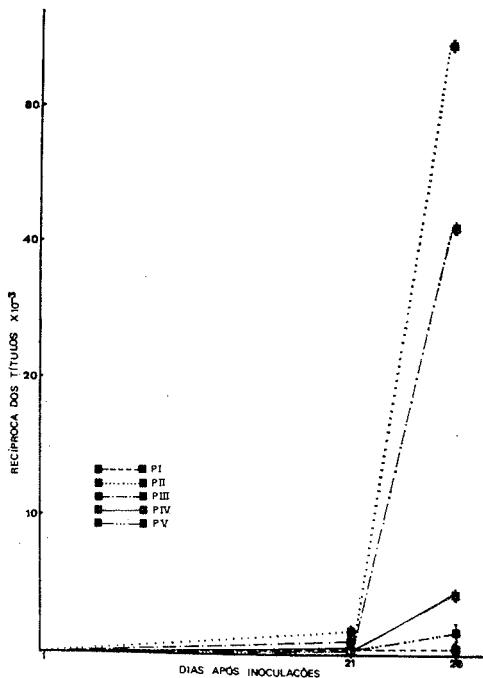


Fig. 4 — Níveis de anticorpos anti-escólex, em coelhos, determinados pelo teste de hemaglutinação indireta usando os picos I, II, III, IV e V do antígeno de escólex.

C. cellulosae e da *T. solium* evidenciando assim, que os resultados positivos obtidos por MAHA-

JAN & col.³, no teste de hemaglutinação indireta com antígeno de verme adulto, em pacientes com cisticercose, podem refletir a dupla infecção ou a ocorrência de reação cruzada.

Os padrões cromatográficos dos antígenos representados na Fig. 3 mostram o alto poder de separação das proteínas dos antígenos pelo DEAE-celulose. A eficácia dessa metodologia permite nos indicá-la para o fracionamento dos antígenos da larva e do verme de *T. solium* pela sua facilidade de execução e reprodutibilidade. O extrato ES apresentou 5 picos, enquanto que nos demais obteve-se 4 picos. Existe semelhança na posição de cada pico nos diferentes antígenos, essa similaridade pode ser devida à existência de identidade antigênica entre os antígenos. Os picos II e III do antígeno ES foram os que detectaram menor concentração de anticorpos pelo teste de hemaglutinação indireta (Fig. 4). A alta antigenicidade desses picos leva a crer que neles estão as substâncias mais antigênicas do *Cysticercus cellulosae*. No pico-III estão presentes 3 linhas na dupla difusão.

As técnicas imunquímicas utilizadas no presente trabalho mostraram-se eficientes no estudo sobre relacionamento antigênico entre

os antígenos solúveis da larva e do verme adulto da *Taenia solium*.

SUMMARY

Immunochemical studies on aqueous extracts of the larvae and adults of *Taenia solium*. II — Antigenic relation; chromatographic patterns; immunologic activity of scolices

Studies were undertaken to detect common antigens between *Taenia solium* and *Cysticercus cellulosae*. Double diffusion tests were carried out using antigens of larval origin (whole larval, larval membranes, contained liquid, scolices), homologous anti serum and adult worm antigen. Seven identical lines of precipitation formed between antibody to scolex and adult worm antigen. Fewer lines of precipitation developed when whole larvae, membrane and respective antibodies were tested against the adult worm antigen. In further double diffusion trials antigens of larval origin were tested against anti-adult worm antibody. Three precipitation lines (only one identical) developed between scolex antigen and antibody to adult worm. Whereas more lines (4-6) formed when other antigens of larval origin were tested.

Five peaks were detected by ion exchange chromatography using DEAE-cellulose. Peaks II and III of the scolex antigen were found to be the most sensitive in detecting larval antibodies in indirect haemagglutination tests.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOYDEN, S. — The absorption of proteins on erythrocytes treated with acid and the subsequent hemagglutination by anti-protein serum. *J. Exp. Med.* 93: 107, 1951.
2. MACHNICKA, B. — Studies on antigen common to *Cysticercus bovis* and *Taenia saginata*. *Parasitic Zoonoses Clinical and Experimental Studies*. Polarol. Edited by E.I.L. Soulsby, New York, Academic Press Inc., 1974, pp. 213-221.
3. MAHAJAN, R. C.; CHITKARA, N. L. & CHOPRA, J. S. — Evaluation of cysticercosis and adult worm antigen in serodiagnosis of cysticercosis. *Indian I. Med. Res.* 62: 1310, 1974.
4. NASCIMENTO, E. & ARAÚJO, F. G. — Estudos imunológicos em extratos aquosos de larva e adultos de *Taenia solium*. I. Imunogenicidade e composição antigênica. *Rev. Inst. Med. trop.* São Paulo 24: 353-358, 1982.
5. PAWLOWSKI, Z. & SCHULTZ, M. G. — Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). *Adv. Parasitol.* 10: 269-343, 1972.
6. STANWORTH, D. R. — A rapid method of preparing pure serum gammaglobuline. *Nature* (London) 188: 156, 1960.
7. STAVITSKY, A. B. — Micromethods for the study of proteins and antibodies I. Procedure and general applications of hemagglutination-inhibition reactions with Tannic Acid and Protein Protein-Treated blood cells. II — Specific applications of hemagglutination and hemagglutination inhibition. *Depart. Mier. Med. Univ. Cleveland, Ohio* 72: 360-375, 1953.

Recebido para publicação em 3/6/1981.