

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Curso de Pós-Graduação (Mestrado e Doutorado) em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

UM ANTÍGENO ESPÉCIE E ESTÁGIO ESPECÍFICO PARA O Schistosoma haematobium. Identificação através de anticorpos monoclonais a partir de imunização de camundongos com antígenos ovulares solúveis.

EDUARDO ANTÔNIO GONÇALVES RAMOS

SALVADOR - BAHIA - BRASIL

1 9 9 3



EDUARDO ANTONIO GONÇALVES RAMOS
Médico

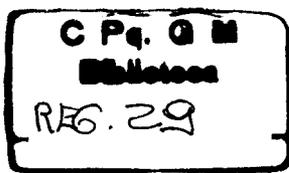
UM ANTÍGENO ESPÉCIE E ESTÁGIO-ESPECÍFICO PARA O Schistosoma haematobium. Identificação através de anticorpos monoclonais a partir de imunização de camundongos Balb/C com antígenos ovulares solúveis.

**Tese apresentada a Faculdade de
Medicina da Universidade Federal da
Bahia para a obtenção do Título de
Doutor em Patologia Humana.**

**Orientador: Prof. Dr. Donald A. Harn Jr.
Co-Orientador: Prof. Dr. Zilton de A. Andrade**

SALVADOR - BAHIA - BRASIL

1993

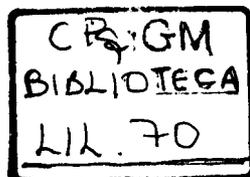


Ramos, Eduardo Antônio Gonçalves
R175 Um antígeno espécie e estágio-específico para
o Schistosoma haematobium. Identificação através de
anticorpos monoclonais a partir de imunização de camundongo
Balb/c com antígenos ovulares solúveis/Eduardo Antônio Gonçalves
Ramos. __ Salvador: Faculdade de Medicina da UFBA, 1993
71p.: il.

Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Universidade
Federal da Bahia.

1. Esquistossomose 2. Imunologia 3. Hibridoma I. Título

CDU: 616.995.122:616-097



11111

MEMORIAL
CO-3111
EVA

616.995.122
R.175a

Aos meus pais, Delza e Armando
Aos meus irmãos.

A minha esposa Neuza e ao meu filho Alan, com muito carinho.

Ao Prof. Zilton de Araujo Andrade, pelo exemplo de dedicação
a pesquisa e ao ensino.

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DO DR. DONALD HARN DO DEPARTAMENTO DE SAÚDE PÚBLICA TROPICAL DA ESCOLA DE SAÚDE PÚBLICA DA UNIVERSIDADE HARVARD, BOSTON, EUA. DURANTE A SUA EXECUÇÃO O PÓS-GRADUANDO RECEBEU UMA BOLSA DE TREINAMENTO EM PESQUISA EM DOENÇAS TROPICAIS DO PROGRAMA TDR, DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Donald Alfred Harn Jr., pela amizade, compreensão, orientação e por tornar possível a realização do nosso treinamento em seu laboratório.

Ao Prof. Zilton de Araújo Andrade, pelo incentivo constante, amizade, orientação e, principalmente, pelo exemplo de cientista e educador.

A Profa. Sonia Gumes Andrade, coordenadora dos cursos de pós-graduação em Patologia Humana, pela compreensão e estímulo constantes.

Ao Prof. John R. David, pela amizade e pelas condições para a realização do nosso treinamento no Departamento de Saúde Pública Tropical da Escola de Saúde Pública da Universidade Harvard.

Ao Prof. Moyses Sadigursky, pela amizade, compreensão e estímulo constantes as nossas atividades científicas.

A Profa. Achilea Bittencourt, pela amizade, confiança e incentivo constantes.

A Roberta David, pela amizade e pelo apoio na nossa estadia em Boston.

A John Quinn, A-Lien Xu, Xao Yin Zou, Sandra Reynolds, Evan Secor, Gu Wei, Albert Ko, Dania Richter, Anat Gross, Andu Gebremichael, Annemarie, Will Kastens e Kinje Hirayama pelo convívio enriquecedor em Boston.

A Rosalia Meires O. da Silva, bibliotecária do Curso de pós-graduação em Patologia Humana, pela orientação nos aspectos formais da tese e pelo auxílio na revisão bibliográfica.

As Senhoras Euridice Sant'anna, Ana Maria Fiscina Sampaio, Ana Cristina Campos e Celeste Barbosa, bibliotecárias do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela ajuda na revisão da literatura.

Aos colegas Luiz Freitas, Mitermayer Reis, Luciano Espinheira, Helenemarie Barbosa, Jane Lenzi, Maria Clara Melro, pelos momentos agradáveis do curso de pós-graduação.

Ao Dr. Roque Almeida, pela confecção computadorizada dos gráficos e figuras.

Ao Jackson Lemos Moreira, pela composição computadorizada do texto.

Ao Sr. Antonio Silva, pela realização das fotocópias.

Aos colegas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

À Organização Mundial da Saúde, mais especialmente ao programa de treinamento em pesquisa de doenças tropicais (Programa TDR), ao qual estivemos vinculados durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Aos professores do Departamento de Anatomia Patologica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

A Neuza e Alan Ramos pela paciência, compreensão e apoio durante a realização deste trabalho.

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta investigação científica.

RESUMO

No presente estudo, relata-se a identificação e caracterização imunoquímica parcial de antígenos específicos do Schistosoma haematobium reconhecidos através de anticorpos monoclonais murinos. Os anticorpos monoclonais foram produzidos em camundongos Balb/C imunizados com antígenos ovulares solúveis por via intraperitoneal. Este trabalho contribui para a identificação de antígenos do S. haematobium que são espécie-específicos e que também só foram detectados nos ovos dos parasitas, sendo também estágio-específicos. A comparação da seqüência parcial de aminoácidos de dois peptídeos tripticos da banda antigenica reconhecida pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 em membrana de nitrocelulose com outras seqüências de proteínas conhecidas revelou, nos dois peptídeos, uma homologia com a proteína "heat-shock" ou proteína de estresse 70 presente em várias espécies animais, incluindo o homem e o S. mansoni.

SUMMARY

One report the identification and the partial immunochemical characterization of Schistosoma haematobium species-specific-antigens recognized by murine monoclonal antibodies. The monoclonal antibodies were produced in Balb/C mice immunized with soluble egg antigens, intraperitoneally. This work shows the identification of S. haematobium epitopes which are species-specific and that only could be detected in the parasite eggs therefore being stage-specific too. The comparison of partial amino acid sequence from two tryptic peptides of the antigenic bands recognized by monoclonal antibody 2D14E8 on nitrocellulose paper disclosed, in both peptides, an homology to heat-shock or stress protein 70 in several animal species, including the man and the S. mansoni.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 GENERALIDADES.....	13
2.2 AS REAÇÕES SOROLÓGICAS PARA IMUNODIAGNÓSTICO EM DOENÇAS PARASITÁRIAS, COM ENFASE NA ESQUISTOSSOMOSE; SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E DIFICULDADES NA EXECUÇÃO	13
2.2.1. O teste da precipitina periovular (COP)	15
2.2.2. Os testes de imunodifusão e de imunoeletroforese	16
2.2.3 O teste da hemaglutinação indireta (HAI)	17
2.2.4 Os testes de imunofluorescência	17
2.2.5 O método imunoenzimático (ELISA)	19
2.2.6 O teste intradérmico	21
2.3 ANTÍGENOS ESQUISTOSSOMÓTICOS USADOS NOS VÁRIOS TESTES DE IMUNODIAGNÓSTICO	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 PARASITAS	29
3.2 ANTÍGENOS	30
3.3 PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OVO	31
3.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	33
3.5 ANÁLISE DA ISOTIPAGEM DE IMUNOGLOBULINAS	34
3.6 ANÁLISE DOS PESOS MOLECULARES DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS.....	34
3.7 SENSIBILIDADE DOS EPITOPOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS AO METAPERIODATO DE SÓDIO.....	36
3.8 ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS DO S. haematobium	36
4 RESULTADOS	38
4.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO- ESPECÍFICOS	38
4.2 ANÁLISE DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS ATRAVÉS DE "WESTERN BLOT"	38
4.3 SENSIBILIDADE DOS EPITOPOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS AO METAPERIODATO DE SÓDIO.....	39
4.4 ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS DO S. haematobium	40
4.5 ISOTIPAGEM DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS PRODUZIDOS	41
5 DISCUSSÃO.....	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Esta tese constitui parte dos trabalhos desenvolvidos durante um treinamento de três anos realizado no laboratório do Dr. Donald Harn, do Departamento de Saúde Pública Tropical da Universidade Harvard (Boston-EUA).

Desenvolvemos neste laboratório, sob orientação do Dr. Donald Harn, um projeto de pesquisa relacionado com a produção de anticorpos monoclonais contra o Schistosoma haematobium que fossem capazes de reconhecer antígenos espécie/estádio-específicos, pudessem ser utilizados em imunodiagnóstico e/ou tivessem algum potencial imunoprolifático. Foram feitas várias tentativas sem sucesso para obter anticorpos monoclonais contra vermes adultos, macho e fêmea. Por outro lado, os anticorpos monoclonais obtidos apresentavam reação cruzada com outras espécies de Schistosoma. Fomos, então, orientados a tentar a geração de hibridomas usando-se os antígenos ovulares solúveis (SEA) do Schistosoma haematobium como agente imunizante.

Embora não tenhamos Schistosoma haematobium no Brasil e, sim, o Schistosoma mansoni, a execução deste projeto de pesquisa nos permitiu obter experiência nos campos da imunologia e imunoquímica e a obtenção de conhecimentos científicos básicos que poderão vir a ser utilizados não só no estudo da esquistossomose mansônica como também no estudo de outras doenças tropicais, como Leishmaniose, Doença de Chagas e Hanseníase, patologias que são bastante comuns em nossa região e vem sendo objeto de estudo do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ, em Salvador-Bahia, local onde trabalhamos.

Por outro lado, a possibilidade de diagnóstico sorológico diferencial entre as esquistossomoses mansônica e hematobia, através de testes usando-se antígenos espécie-específicos, é de grande importância (Faray e cols., 1978; Hillyer e cols., 1980; Barsoum e cols., 1990). Existem extensas áreas na África e no Oriente Médio onde ambas as infecções ocorrem simultaneamente e esta diferenciação permitiria a aplicação da

quimioterapia mais adequada (El Aiamy e Cline, 1977). Surge, portanto, a necessidade de serem desenvolvidas técnicas diagnósticas mais sensíveis uma vez que os exames laboratoriais de fezes nem sempre possibilitam o diagnóstico da infecção. Além disso, os testes sorológicos baseados na detecção de antígenos espécie-específicos poderiam ser correlacionados com a carga parasitária dos pacientes. O uso de tais antígenos propiciaria, ainda, a realização de estudos soropidemiológicos retrospectivos mais precisos e rápidos.

Por outro lado, a avaliação da intensidade de infecção bem como a detecção de mais de uma espécie de esquistossomo têm sido até agora, baseadas apenas na presença de ovos na urina ou nas fezes dos hospedeiros. Contudo, em certas formas clínicas da doença, como nas infecções com baixa carga parasitária, os ovos podem não ser eliminados ou o são de modo muito irregular, mesmo na vigência de vermes vivos, não havendo uma boa correlação entre carga de vermes e a excreção fecal de ovos, principalmente em infecções com baixa carga parasitária. Para contornar esta dificuldade, têm-se tentado desenvolver sondas sorológicas. O teste ideal seria aquele que pudesse fazer um diagnóstico seguro e espécie-específico antes da postura dos ovos, o que poderia propiciar o tratamento adequado antes que as lesões granulomatosas surgissem.

Com o advento da tecnologia do hibridoma (Kohler e Milstein, 1975), pensou-se que haveria o aprimoramento da especificidade dos testes de imunodiagnóstico (Cruise e cols., 1983; Mitchell e cols., 1983; Tiu e cols., 1989). Usando-se, criteriosamente, anticorpos monoclonais específicos para um parasita ou estágio evolutivo do mesmo, testes de ELISA poderiam ser desenvolvidos baseados na detecção de anticorpos contra antígenos purificados pela coluna de cromatografia de afinidade usando-se o anticorpo monoclonal. A propriedade de alta especificidade é exatamente a que é requerida de um teste para detecção de um parasita. Todavia, poderia acontecer que a sensibilidade ficasse comprometida pelo fato de que o teste imunodiagnóstico estaria baseado na detecção de uma resposta imune contra um único determinante antigênico, ou um número limitado de determinantes. Para que um teste de imunodiagnóstico baseado em hibridoma seja útil, seria necessário assumir-se como verdadeira a premissa de que todos os

indivíduos infectados responderiam a um limitado espectro de antígenos. Levando-se em consideração tais dados relacionados com a sensibilidade, anticorpos monoclonais poderiam ser utilizados em imunodiagnóstico sob dois prismas: o primeiro, a identificação de anticorpos monoclonais contra antígenos imunodominantes específicos para o parasita, sendo os anticorpos monoclonais usados para o isolamento e purificação do antígeno; segundo, o uso de anticorpos de hibridomas contra antígenos compartilhados (e que são responsáveis pelas reações cruzadas e falsos positivos) para a depleção destes antígenos do mosaico antigênico nativo.

Apresentaremos nesta tese, os resultados iniciais de nossos estudos sobre a produção de anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos espécie e estágio-específicos do S. haematobium e a caracterização imunológica parcial da proteína específica inclusive com a obtenção de parte da sua seqüência de aminoácidos e a sua identificação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

Segundo a Organização Mundial da Saúde (Report of a meeting on application of immunodiagnosis in schistosomiasis, 1992), o papel do teste imunodiagnóstico na esquistossomose poderia ser analisado sob vários pontos de vista básicos: 1) especificações para métodos direcionados ao suporte de medidas de controle da doença; 2) avaliação da morbidade; 3) monitoração do estado da imunidade específica (grau de proteção); 4) avaliação de vacinas. No entanto, foi recomendado que a maior prioridade fosse dada ao desenvolvimento de testes para uso nos programas de controle da endemia visando, principalmente, a identificação e tratamento de pessoas (comunidades) infectadas e a monitoração da eficiência da quimioterapia, do controle de transmissão e da profilaxia.

2.2 AS REAÇÕES SOROLÓGICAS PARA IMUNODIAGNÓSTICO EM DOENÇAS PARASITÁRIAS, COM ÊNFASE NA ESQUISTOSSOMOSE; SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E DIFICULDADES NA EXECUÇÃO

Os métodos imunológicos para a detecção indireta de parasitas têm grande aplicação na epidemiologia das infecções parasitárias e no diagnóstico individual de pessoas infectadas (Mitchell, 1981). Os grandes obstáculos dos testes sorológicos são a baixa sensibilidade, as reações cruzadas e as dificuldades na padronização do teste diagnóstico.

É muito conhecida a dificuldade encontrada na obtenção de um método diagnóstico que faça distinção específica entre os vários helmintos, por exemplo, devido à alta frequência de reação cruzada decorrente da presença de antígenos comuns a vários vermes que são formados por misturas antigênicas glico-lipo-proteicas complexas.

O valor de um teste imunodiagnóstico está na possibilidade dele ser usado em grande escala, ser de fácil execução no campo e capaz de fornecer informações sobre a intensidade e duração da infecção, a possibilidade de reações imunopatológicas e o estado imune do hospedeiro (Mitchell, 1981, Cohen, 1984). Estes requisitos, no entanto, considerados ideais, são muito difíceis de serem obtidos nos diferentes testes de imunodiagnóstico.

De referência aos testes diagnósticos, temos que levar em consideração a sua sensibilidade, especificidade e o valor preditivo positivo (Guimarães, 1985). A sensibilidade é a capacidade que um teste tem de discriminar, dentre os suspeitos de uma patologia, aqueles efetivamente doentes, representando a positividade na doença (Galen e Gambino, 1975). A especificidade é a capacidade que o mesmo teste tem de ser negativo em soros de indivíduos que, sabidamente, não têm a doença, representando a negatividade na saúde (Galen e Gambino, 1975). A qualidade que tem um teste de identificar corretamente os indivíduos verdadeiros positivos denomina-se de valor preditivo positivo, o qual é obtido através de uma fórmula onde constam os valores da sensibilidade, da especificidade e a prevalência da doença na população. Deste modo, testes com altas sensibilidade e especificidade podem deixar de confirmar corretamente a hipótese diagnóstica se forem utilizados para diagnosticar doenças com baixa prevalência numa população. Somente em condições de prevalência superior a 50% e que o valor preditivo positivo aproxima-se da sensibilidade do teste. A detecção dos verdadeiros positivos fica condicionada à capacidade do teste não acusar resultados positivos dentre indivíduos sadios, ou seja, a sua especificidade.

Numerosos testes imunodiagnósticos para a esquistossomose estão disponíveis, entre os quais podemos citar o teste da precipitina periovular, a intradermoreação, a hemaglutinação indireta, a imunodifusão em agarose e as imunoeletroforeses, a imunofluorescência e, mais recentemente, os testes imunoenzimáticos (ELISA), sobre os quais faremos comentários gerais.

Diversas técnicas sorológicas podem avaliar anticorpos diferentes e, para obter-se o máximo de sensibilidade e especificidade, deve-se realizar mais de um teste. Nos

estágios iniciais da infecção, os níveis de anticorpos são baixos e os testes podem não ser bastante sensíveis.

Faremos a seguir, uma análise geral dos principais métodos imunodiagnósticos que vêm sendo utilizados em doenças parasitárias, especialmente, em esquistossomose.

2.2.1. O teste da precipitina periovular (COP)

Este teste baseia-se na formação de precipitados em forma de bolhas ou de segmentações, quando se incubam ovos de esquistossoma com soro de pacientes esquistossomóticos (Olivier-Gonzalez, 1954). Tais precipitados correspondem a formação de complexos antígeno-anticorpo e contêm IgG1, IgM e IgA (Kagan e cols., 1958). Este teste é trabalhoso e exige o emprego de ovos frescos ou liofilizados. Sua sensibilidade é de 90 a 95 % e oferece boa especificidade (Mello e cols., 1978, Ruiz-Tiben e cols., 1979). Permite identificar infecção de grau discreto cujo diagnóstico poderia escapar ao exame parasitológico de fezes (Hillyer e cols., 1981; Lambertucci e cols., 1983). Pode ainda ser utilizado como critério de cura pois o teste torna-se negativo 6 a 10 meses após o tratamento (Hillyer e cols., 1981). Por outro lado, embora este teste seja espécie-específico para o S. japonicum, ele não faz distinção entre os S. mansoni e S. haematobium (Yogore e cols., 1968).

Hillyer e cols. (1979) comparando este teste com as técnicas do ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioimunoensaio com a finalidade de detectar anticorpos contra algumas formas de antígenos ovulares solúveis, analisaram 121 pacientes infectados pelo S. mansoni tendo como controle soros de pacientes parasitados por equinococose, fasciolíase, cisticercose e triquinose. Esses autores verificaram que o teste COP teve uma sensibilidade de 95% e foi capaz de identificar 100% dos pacientes excretando 10 ou mais ovos por grama de fezes, sendo a sua especificidade de 96%. O teste COP mostrou-se altamente sensível e específico além de ser gênero específico com exceção dos casos com triquinose. Na experiência dos autores, o COP é mais acurado na detecção de indivíduos infectados do que um único exame parasitológico de fezes. Em

nas onde a triquinose é rara ou ausente, o teste COP positivo pode ser interpretado como uma prova parasitológica de infecção pelo S. mansoni ou S. japonicum.

2.2. Os testes de imunodifusão e de imunoelectroforese

Os métodos que utilizam gel de agarose começaram a ter um uso geral a partir de 1947 com o desenvolvimento do teste de Oudin seguido pela técnica de imunodifusão de Ouchterlony (1947), imunoelectroforese (Grabar and Williams, 1953) e a electroforese em contracorrente (Edwards, 1971). Com o método da imunoelectroforese, bandas específicas de precipitação antígeno-anticorpo são identificadas em várias infecções parasitárias. Embora o teste seja trabalhoso e exija uma grande quantidade de antígeno e soro, a sua habilidade em detectar reações antígeno-anticorpo gênero e espécie-específicas o faz extremamente útil no diagnóstico.

Todavia, Hillyer e cols. (1979), comparando vários métodos de imunodiagnósticos para a esquistossomose, realizaram a imunodifusão com antígenos ovulares solúveis em gel, verificando que a técnica tem uma baixa sensibilidade (41%) e apresenta uma especificidade de apenas 83%, não permitindo quantificação. Resultados pouco encorajadores no que se refere à sensibilidade e especificidade, 67% e 84% respectivamente, já tinham sido obtidos por Ruiz-Tiben e cols. (1979) quando aplicaram a imunodifusão, utilizando extratos de vermes adultos e de cercárias. Novamente, Hillyer e cols. (1981), comparando o COP e imunodifusão para diagnóstico de infecção causada pelo S. mansoni e/ou S. haematobium, verificaram que, usando extrato de verme adulto como antígeno, a imunodifusão falhou em diagnosticar corretamente um em cada cinco indivíduos infectados.

áreas onde a triquinose é rara ou ausente, o teste COP positivo pode ser interpretado como uma prova parasitológica de infecção pelo S. mansoni ou S. japonicum.

2.2.2. Os testes de imunodifusão e de imunoelektroforese

Os métodos que utilizam gel de agarose começaram a ter um uso geral a partir de 1947 com o desenvolvimento do teste de Oudin seguido pela técnica de imunodifusão de Ouchterlony (1947), imunoelektroforese (Grabar and Williams, 1953) e a eletroforese contracorrente (Edwards, 1971). Com o método da imunoelektroforese, bandas específicas de precipitação antígeno-anticorpo são identificadas em várias infecções parasitárias. Embora o teste seja trabalhoso e exija uma grande quantidade de antígeno e soro, a habilidade em detectar reações antígeno-anticorpo gênero e espécie-específicos o faz extremamente útil no diagnóstico.

Todavia, Hillyer e cols. (1979), comparando vários métodos de imunodiagnósticos para a esquistossomose, realizaram a imunodifusão com antígenos ovulares solúveis brutos, verificando que a técnica têm uma baixa sensibilidade (41%) e apresenta uma especificidade de apenas 83%, não permitindo quantificação. Resultados pouco encorajadores no que se refere à sensibilidade e especificidade, 67% e 84% respectivamente, já tinham sido obtidos por Ruiz-Tiben e cols. (1979) quando aplicaram a imunodifusão, utilizando extratos de vermes adultos e de cercárias. Novamente, Hillyer e cols. (1981), comparando o COP e imunodifusão para diagnóstico de infecção causada pelo S. mansoni e/ou S. haematobium, verificaram que, usando extrato de verme adulto como antígeno, a imunodifusão falhou em diagnosticar corretamente um em cada cinco indivíduos infectados.

2.2.3 O teste da hemaglutinação indireta (HAI)

É uma técnica de alta reatividade estando indicada para a análise de grande número de amostras de soro através de métodos de microtitulação, mas não têm boa sensibilidade na fase aguda inicial da infecção.

Deelder e cols. (1989) investigaram a aplicabilidade de anticorpos monoclonais murinos da classe IgM em hemaglutinação indireta para se estabelecer os níveis do antígeno catódico circulante (CCA) e do antígeno circulante anódico (CAA) em soros humanos. Eles verificaram que o teste de hemaglutinação indireta com anticorpos monoclonais aumenta significativamente a sensibilidade do teste na detecção dos antígenos circulantes em pacientes esquistossomóticos. Mas Deelder e Eveleigh (1978) já haviam sido os primeiros pesquisadores a detectar, através de hemaglutinação indireta, CAA no soro de hamsters infectados pelo S. mansoni com alta sensibilidade.

2.2.4 Os testes de imunofluorescência

Sadun e cols. (1960) foram os primeiros a introduzir a imunofluorescência indireta (Coons e Kaplan, 1950) no diagnóstico da esquistossomose usando como antígeno cercárias de S. mansoni. Este teste têm a desvantagem de dar reação cruzada com anti-soros contra Trichinella spiralis, Fasciola gigantica e esquistossomas de bovinos, aves e de roedores. Wilson e cols. (1974), tentando aperfeiçoar o método, utilizaram como antígeno secções de vermes adultos e cercárias cortadas ao criostato e avaliadas frente a soros de pacientes infectados pelo S. mansoni e S. haematobium com controles não infectados. Esses autores verificaram que o antígeno de verme adulto embebido em meio Tissue-Tek OCT (Ames Co., Miles Laboratory, USA) forneceu as melhores índices de sensibilidade e especificidade. Os antígenos de cercárias apresentaram intensa reação cruzada com soro anti-Trichinella e formação de cristais de gelo quando as cercárias foram embebidas em OCT.

Kanamura e cols. (1979) estudaram 10 pacientes com a forma aguda e 30 com a forma crônica da esquistossomose mansônica com a finalidade de correlacionar a classe de anticorpos circulantes com o padrão de imunofluorescência em secções de vermes adultos e de fígado contendo granulomas, cortadas ao criostato. Eles verificaram que, durante a fase aguda, houve predomínio de IgA de modo diferencial ao lado de IgM. Por outro lado, na fase crônica não detectaram IgA e observaram uma presença significativa de IgG, sendo a IgM muito menos intensa.

Dias e cols. (1990) estudaram 1453 casos com idade superior a 14 anos de idade e 1044 com idade inferior a 14 anos, todos residentes em uma área endêmica para esquistossomose mansônica em São Paulo comparando as técnicas de Kato-Katz quantitativo (Katz e cols., 1972), teste intradérmico e imunofluorescência. A finalidade deste trabalho foi a de determinar a prevalência da doença através de um modelo probabilístico. A imunofluorescência foi realizada com antígeno de verme adulto, sendo detectada as imunoglobulinas G. Neste estudo, as sensibilidade e especificidade para todas as idades foram de 98,8% e 78,9% respectivamente. A prevalência geral da esquistossomose calculada através da imunofluorescência foi de 55,5% em comparação com 44,3% da prevalência real da doença. A técnica da imunofluorescência revelou alta sensibilidade para ambos os grupos etários mas sua especificidade foi satisfatória apenas para crianças, (92,1%) quando comparada com a dos adultos (69,2%). Estes achados mostram que este teste é ideal para o diagnóstico da esquistossomose na infância. Além disso, a sensibilidade da imunofluorescência não depende da carga parasitária como a técnica parasitológica.

O custo de um microscópio de imunofluorescência, a subjetividade da leitura do teste e os problemas técnicos na avaliação de um grande número de amostras séricas são aspectos que têm dificultado uma maior aplicação deste método.

O desenvolvimento de um fluorômetro confiável resultou na técnica conhecida como FIAX (Kagan, 1979). O fluorômetro é usado para quantificar a imunofluorescência de um disco de acetato de celulose saturado com antígeno solúvel ao qual se fez reagir, sequencialmente, soro de paciente e soro anti-imunoglobulina conjugado com

isotiocianato de fluoresceína. Métodos similares empregando "beads" de agarose têm sido desenvolvidos, como o teste de esferas substratos com antígenos definidos (DASS) para o diagnóstico de esquistossomose e outras infecções parasitárias (Deelder e Ploem, 1974; Deelder e cols., 1977). Esses autores acoplaram covalentemente antígenos do S. mansoni a "beads" de agarose como um agente matriz para a reação de imunofluorescência para esquistossomose, utilizando soro de pacientes e de animais infectados. Este sistema revelou ser tão sensível quanto a reação de imunofluorescência usando-se secções congeladas do verme adulto como antígeno. O método FIAX é a técnica de imunofluorescência à qual se acrescenta a quantificação da reação de modo automatizado. Este método combina as vantagens técnicas da hemaglutinação indireta citadas anteriormente, com a sensibilidade e especificidade do método de imunofluorescência conforme já mencionado. Todavia os métodos FIAX e DASS utilizam antígenos solúveis, ao passo que o teste de imunofluorescência emprega antígenos tanto solúveis quanto da superfície membranar de parasitos, sendo possível que ambos os testes possam detectar diferentes anticorpos. Um teste FIAX utilizando antígeno purificado de membrana poderia se aproximar da eficiência do teste de imunofluorescência.

2.2.5 O método imunoenzimático (ELISA)

A substituição do isotiocianato de fluoresceína por enzimas como a peroxidase derivada do "horse-radish", ou a fosfatase alcalina e a visualização de produtos químicos coloridos diferentes em decorrência da interação enzima-substrato formam a base para o teste imunoenzimático (ELISA). Nesta técnica (Engvall e Perlmann, 1972), modificada por Voller e cols. (1976), antígeno solúvel e ligado à superfície de uma fase sólida tal como pocinhos de uma microplaca ou tubos de poliestireno ou polivinila, através de pontes hidrofílicas. Este teste pode ser automatizado para uso em larga escala e, devido a sua boa sensibilidade, vem sendo muito utilizado para o diagnóstico de doenças parasitárias.

McLaren e cols. (1978) descreveram o teste de ELISA em estudos epidemiológicos com grande número de indivíduos esquistossomóticos representantes de várias áreas rurais, sendo utilizados antígenos brutos derivados de vermes adultos e de ovos do S. mansoni, cepa Porto Rico, sendo tal técnica comparada com a imunofluorescência e a reação de fixação de complemento. Eles verificaram que o teste ELISA é tão sensível quanto a imunofluorescência. Sendo, no entanto, mais específico. Verificaram também a existência de muitas reações cruzadas com infecções com outros esquistossomas humanos e de outros animais. Hillyer e Gomes de Rios (1979a) e Hillyer e cols. (1979b), estudando o teste de ELISA no diagnóstico da esquistossomose e utilizando os antígenos ovulares solúveis brutos, verificaram que o teste têm boa sensibilidade e especificidade quando se utilizam bons controles positivo e negativo. Contudo, verificaram a existência de intensa reação cruzada quando se utiliza soro de indivíduos com fasciolíasis, triquinose, cisticercose e equinococose. Concluíram que, para este teste ser efetivo são necessários mais estudos sobre a purificação dos antígenos ovulares solúveis. Deelder e cols. (1980), tentando estabelecer que tipo de antígeno melhor se adaptaria ao teste de ELISA, utilizaram antígenos de verme adulto e ovulares purificados e concluíram que ambas as preparações antigênicas utilizadas deram bons resultados porém estes foram melhores com soros de crianças que de adultos. Os melhores resultados foram obtidos com a fração solúvel no ácido tricloroacético do antígeno de verme adulto, que contém o proteoglicano do antígeno circulante anódico.

Um avanço significativo do método de ELISA pode ser a detecção de antígenos nos fluídos corpóreos de pacientes infectados com doenças parasitárias. Nestas situações, anticorpos podem persistir depois da cura quimioterapêutica, mas a sua mensuração não têm sido útil na avaliação da carga parasitária. Técnicas sensíveis para a detecção de antígenos circulantes podem tornar possível a avaliação de tal parâmetro.

2.2.6 O teste intradérmico

O teste intradérmico é um dos testes utilizados como meios diagnósticos mais criticado por ser pouco sensível e não específico. As razões para este conceito errôneo são os resultados equivocados que vem sendo relatados por investigadores que não levam em consideração a natureza quantitativa do teste intradérmico, a necessidade de se usar reagentes padronizados e a complexidade da resposta do hospedeiro. Alguns autores (Pellegrino, 1958; Kagan e cols., 1961a e 1961b; Pellegrino e cols., 1960a e 1960b) chamam a atenção para a necessidade de se medir a área da reação cutânea.

Este teste é rápido, sensível e de grande valor para estudos sobre prevalência de infecções parasitárias. Com o desenvolvimento de antígenos padronizados, purificados e ajustados, e seguindo rigorosamente do protocolo para a execução do teste, várias informações úteis podem ser obtidas quando realizado corretamente e com os resultados interpretados adequadamente o teste cutâneo avalia tanto a resposta humoral como a celular do hospedeiro. Pode contribuir também para estudos sobre o estado imune do hospedeiro (Moriearty e cols., 1974a e 1974b).

Hiatt e cols. (1978) avaliaram o teste intradérmico em pacientes esquistossomóticos diagnosticados pelo exame de fezes pela técnica do formol-éter modificada por Ritchie, sendo seguidos os critérios de Kagan e cols. (1966). Os autores verificaram que o teste intradérmico revelou um quadro inacurado diferente do verdadeiro estado infeccioso da comunidade. Nos seus estudos foi encontrada uma sensibilidade muito baixa em crianças (em torno de 36%) enquanto que, em adultos a sensibilidade foi de 79%. Por outro lado, a especificidade em adultos foi de apenas 68% enquanto que, em crianças observou-se 96% de especificidade. A pouca especificidade do teste intradérmico em adultos pode ser explicada pela provável ocorrência de infecções antigas. A ocorrência de reações falso positivas em áreas endêmicas contribui substancialmente para a falta de especificidade do teste. Uma outra causa importante para a baixa especificidade e a interação entre infecções esquistossomóticas humanas e as infecções esquistossomóticas em aves e mamíferos. Estas últimas infecções não são

precisamente detectadas em países do terceiro mundo o que dificulta uma melhor interpretação dos resultados dos testes intradérmicos.

2.3 ANTÍGENOS ESQUISTOSSOMÓTICOS USADOS NOS VÁRIOS TESTES DE IMUNODIAGNÓSTICO

Existem muitos testes para o diagnóstico sorológico da esquistossomose, baseados em anticorpos anti-esquistossoma e usando antígenos parasitários brutos ou parcialmente purificados. Estes testes não indicam infecção ativa ou carga parasitária como a que é conseguida pelo exame parasitológico de fezes. No entanto, alguns deles, que avaliam a presença de anticorpos anti-ovos, apresentam uma correlação entre níveis de anticorpos e a carga parasitária. A detecção de antígenos circulantes em fluidos corpóreos do hospedeiro poderia indicar uma infecção ativa e oferecer uma melhor correlação com a carga de vermes (Deelder e cols., 1989).

A detecção de antígenos esquistossomóticos envolve tanto a avaliação de antígenos do verme adulto, como a de estágios larvários e de antígenos derivados dos ovos. O antígeno ideal seria aquele oriundo dos estágios mais iniciais do parasita no hospedeiro definitivo, particularmente os estágios larvários ou os vermes adultos imaturos, visto que o diagnóstico e tratamento da doença poderiam ser feitos, seguramente, antes do aparecimento de ovos que são o principal fator patogênico das lesões da esquistossomose.

O uso de extratos brutos de antígenos esquistossomóticos, sejam eles derivados dos vermes adultos ou de ovos, têm sido pouco encorajador. Os parasitas têm uma grande complexidade antigênica e são formados por um grande mosaico de proteínas e glicoproteínas, e, por isso, é muito importante que haja purificação de antígenos para o seu emprego em diagnóstico e imunoprofilaxia. São poucas as informações detalhadas sobre a participação de antígenos esquistossomóticos purificados na resposta imune ao helminto ou mesmo sua relevância no imunodiagnóstico da infecção (Bout e Carlier, 1982).

Em 1976, Pelley e cols. identificaram três diferentes glicoproteínas derivadas do SEA do S. mansoni denominadas MSA1, MSA2 e MSA3. O MSA1 é altamente estágio e espécie-específico e têm maior importância em imunodiagnóstico. O mesmo grupo de pesquisadores (Hamburger e cols., 1976) demonstrou também que o MSA1 parece ser pelo menos um dos antígenos responsáveis pela indução do granuloma peri-ovular, tendo-se caracterizado que os ovos imaturos contêm cerca de 10 vezes menos MSA1 que ovos maduros. Este antígeno foi testado para diagnóstico através do radioimunoensaio, sendo verificadas uma sensibilidade de 100% e uma elevada especificidade (Pelley e cols., 1977). Demonstrou-se, também, através do teste da precipitina peri-ovular que o anticorpo monoclonal anti-MSA1 reage com ovos de esquistossomas (Hillyer e Pelley, 1980). No entanto, este anticorpo também oferece reação cruzada com outras espécies de esquistossomas humanos.

Objetivando melhor caracterizar a complexa mistura de antígenos ovulares do S. mansoni, Carter e Colley (1979) utilizaram a cromatografia de afinidade utilizando a concanavalina A (Con A) ligada à Sepharose 4B, estudando as frações obtidas. A análise pela eletroforese em acrilamida demonstrou que na fração que não se ligava a Con A pelo menos 20 bandas proteicas distintas e três glicoproteínas estavam presentes. Por outro lado, na fração que se ligava a Con A, pelos menos seis glicoproteínas distintas puderam ser visualizadas. O mesmo grupo de cientistas (Harrison e cols., 1979), comparando tais resultados com aqueles obtidos através do fracionamento de antígenos ovulares com cromatografia de imunoafinidade e usando soro de camundongos com 16 semanas de infecção pelo S. mansoni, verificou que os antígenos ovulares assim purificados continham aqueles antígenos mais importantes detectados com a coluna de Con A.

Em 1979, Boctor e cols. isolaram e purificaram um antígeno polissacarídeo de ovos de S. mansoni com peso molecular em torno de 200 kDa, composto principalmente por hexoses neutras. Este antígeno pode ser detectado no soro de camundongos com infecção aguda e crônica pelo S. mansoni, parecendo ser específico para o S. mansoni.

Na tentativa de correlacionar o SEA fracionado por cromatografia de troca iônica, eletroforese preparativa e eletroforese em acrilamida com hipersensibilidade tardia,

Brown e cols. (1977) mostraram que o SEA contém pelo menos três antígenos capazes de provocar hipersensibilidade tardia em testes cutâneos em cobaias sensibilizadas com ovos de S. mansoni. Sugeriram a existência de semelhanças dos antígenos acima mencionados com aqueles descritos por Pelley e cols. em 1976 (MSA1 e MSA2).

Dunne e cols. (1981) identificaram e purificaram parcialmente um antígeno ovular do S. mansoni (W1) que têm efeito hepatotóxico em camundongos depletados de linfócitos T e maciçamente infectados pelo S. mansoni. Este antígeno têm entre 20 e 50 kDa, é um carboidrato que induz a formação de intensa degeneração hidropica em hepatocitos, alterações essas que podem ser evitadas quando os animais são tratados com soro de outros camundongos cronicamente infectados pelo S. mansoni.

Hamburger e cols., (1982) identificaram e purificaram parcialmente uma glicoproteína de ovos de S. haematobium, denominada de MEGL-H de peso molecular de 70 kDa. Esta glicoproteína foi altamente reativa com uma mistura de soros de pacientes com esquistossomose haematobia através do radioimunoensaio. Estudos de inibição do radioimunoensaio mostraram que ovos do S. mansoni contêm componentes que produzem uma limitada reação cruzada com a MEGL-H. Estes achados mostram que tal glicoproteína poderia ser uma sonda sorodiagnóstica em potencial.

Dois antígenos esquistossomóticos têm sido estudados extensivamente pela sua habilidade em diferenciar esquistossomose aguda e crônica. Em pacientes esquistossomóticos, são detectados precocemente, na fase aguda, anticorpos dos tipos IgG e IgM contra o GASP. O GASP é um proteo-glican anódico que é associado ao intestino dos vermes, com peso molecular variando de 66 a 340 kDa (Nash e cols., 1974, 1981, 1983; Nash, 1978; Andrade e Sadigursky, 1978). Por outro lado, animais crônica e maciçamente infectados apresentam elevados níveis de anticorpos contra "Phenol Sulfuric Active Peak" (PSAP), uma glicoproteína cuja mobilidade relativa varia de 90 a 130 kDa. Tendo em vista estes dados, Norden e Strand (1985) fizeram um estudo visando a identificação de glicoproteínas do S. mansoni reconhecidas por soros de camundongos durante o curso da infecção, através da imunoprecipitação com antígenos do verme adulto e de cercária, utilizando metionina marcada com o isótopo radioativo do enxofre

(S³⁵). A resposta humoral inicial específica (5^a semana) foi direcionada contra três glicoproteínas de vermes com peso molecular de 35, 52 e 55 kDa. Com o progredir da infecção, todas as proteínas mais preponderantes (variando de 12 a 140 kDa) foram precipitadas pelo soro de cada camundongo e somente mínimas variações individuais foram detectadas contra essas glicoproteínas. Com vinte semanas, ocorreu imunoreatividade máxima contra as glicoproteínas radiomarcadas e permaneceu neste nível até 50 semanas. Experimentos similares conduzidos com soros de pacientes com infecções aguda e crônica resultaram em padrões de imunoprecipitação quase que idênticos aos obtidos com os soros dos camundongos.

O mesmo grupo de pesquisadores (Norden e Strand, 1984), tentando identificar antígenos ovulares solúveis espécie-específicos e aqueles associados com reação cruzada com referência às três espécies de esquistossomas patogênicas para o homem, usando extrato de ovos marcado com o isótopo radioativo do iodo (¹²⁵I) e após radioimunoprecipitação com soro de pacientes infectados com os vários parasitas, analisou o material antigênico através da eletroforese uni e bidimensional, caracterizando peso molecular e ponto isoelétrico. Com base na imunorreatividade, estes autores não foram capazes de distinguir entre o soro de pacientes infectados pelo S. mansoni e aqueles de pacientes infectados pelo S. haematobium. Do mesmo modo, a resposta-imune humoral de pacientes infectados pelos S. japonicum e S. mekongi não pode ser diferenciada. Todavia, os autores verificaram que uma glicoproteína importante do S. mansoni (número 8) e duas glicoproteínas do S. haematobium (números 10 e 11) foram reconhecidas em grau maior pelos soros de pacientes infectados com S. mansoni e S. haematobium do que pelos soros de pacientes infectados pelos S. japonicum e S. mekongi, ou de que outros pacientes infectados por outros parasitas não pertencentes ao gênero esquistossoma. Essas glicoproteínas guardam alguma semelhança com os antígenos MSA1 de Pelley e cols. (1976) e com a glicoproteína MEGL-H de 70 kDa descrita por Hamburger e cols. (1982), sendo consideradas gênero e espécie-específicas. Ainda na tentativa de encontrar um antígeno que se correlacionasse com a infecção esquistossomótica, Ruppel e cols. (1985) compararam a reação em "imunoblots" de soros obtidos de pacientes

infectados pelo S. mansoni e comprovados parasitologicamente com soros de pacientes com história suspeita de esquistossomose e aqueles com doenças parasitárias não mencionadas. Os autores verificaram que um componente antigênico em torno de 31 kDa reagiu com todos os soros dos pacientes esquistossomóticos bem como aqueles suspeitos da parasitose, não sendo observada reação com soros de pacientes albergando outros parasitas. Este antígeno, um polipeptídeo, estava presente em vermes de ambos os sexos e parece originar-se do intestino do esquistosoma. Outros estudos seriam necessários para se verificar a potencialidade deste antígeno em imunodiagnóstico.

Tracy e cols. (1985) purificaram uma glicoproteína a que chamaram de 2, de ovos do S. japonicum e, testando o seu potencial em diagnóstico através do método de ELISA foram capazes de identificar os pacientes realmente infectados pelo S. japonicum entre outros parasitados por várias espécies de esquistossomas ou por outros vermes, com altas sensibilidade e especificidade.

Deve-se levar também em consideração que os esquistossomas são parasitas intravasculares e, em consequência secretam e excretam diversos antígenos diretamente na corrente sanguínea onde são processados pelo hospedeiro. Alguns desses antígenos são degradados pelo fígado e excretados como substâncias não antigênicas de baixo peso molecular, enquanto outros são excretados na urina e leite como compostos antigênicos (Santoro e cols., 1977 e 1980). Assim, a identificação e caracterização destes antígenos são muito importantes. A detecção de anticorpos contra antígenos esquistossomóticos é indicativa de infecção passada ou presente e, em alguns casos, o nível de resposta pode ser correlacionado com parâmetros clínicos. Por outro lado, a presença de antígeno esquistossomótico no hospedeiro é indicativa de infecção ativa e algumas vezes, a quantidade do antígeno detectado pode ser correlacionada com a intensidade da infecção. Vários antígenos esquistossomóticos contendo carboidratos têm sido caracterizados e testes para a detecção destes antígenos ou de seus anticorpos correspondentes estão sendo cada vez mais utilizados para diagnóstico e análise clínica da esquistossomose humana. Dentre esses antígenos, destacam-se o PSAP, o antígeno

catódico circulante (CCA), o antígeno circulante anódico (CAA) e o proteoglican associado ao intestino do verme (GASP) (Nash e cols., 1985). Estes antígenos foram comparados através de radioimunoensaio empregando anticorpos monoclonais específicos dos vários antígenos assim como teste de inibição, utilizando-se as glicoproteínas originais. Por essas técnicas, PSAP e CCA foram consideradas glicoproteínas distintas, enquanto que os dois compostos anódicos, GASP e CAA, foram considerados como moléculas idênticas. Alguns desses antígenos (CAA e CCA) têm sido utilizados em testes de ELISA para a detecção de anticorpos específicos (Deelder e cols., 1980) com bons resultados, principalmente, em crianças. Todavia, a detecção destes antígenos no soro de pacientes infectados têm sido problemática em virtude dos seus baixos níveis séricos. O mesmo grupo de pesquisadores (Deelder e cols., 1989) investigou a aplicabilidade de anticorpos monoclonais murinos da classe IgM em testes de hemaglutinação indireta para se estabelecer os níveis séricos de CAA e CCA em soros humanos. Foram encontradas reações para o CAA em amostras de soro mas nunca em amostras de urina, havendo uma forte correlação entre os títulos de anticorpos anti-CAA e o número de ovos. Em contraste, o CCA foi detectado tanto no soro como na urina e o seu nível correlacionou-se muito bem com a contagem de ovos. Pode-se portanto concluir que o uso de anticorpos monoclonais anti-CAA nos testes de hemaglutinação indireta aumenta significativamente a sensibilidade do teste.

Em 1990, Fu e Carter produziram um anticorpo monoclonal específico para o SEA do S. japonicum e usaram tal anticorpo em um teste de ELISA para a detecção de antígenos circulantes em pacientes infectados pelo S. japonicum, nas fases aguda e crônica. O antígeno reconhecido por este anticorpo monoclonal é uma proteína de 70 kDa encontrada tanto no SEA como no SWAP e parece ser uma proteína "heat shock" de peso molecular 70 kDa. O teste de ELISA utilizando esta imunoglobulina monoclonal teve uma positividade de 93% nos pacientes com esquistossomose japonesa aguda, 98% de positividade em pacientes crônicos, sendo negativo nos controles não esquistossomóticos. De 26 pacientes portadores de esquistossomose mansônica, apenas um apresentou reação positiva. Verificou-se também que não houve diferença significativa

entre pacientes das fases aguda e crônica, não havendo também correlação entre concentração antigênica e eliminação de ovos. Aspecto interessante neste estudo foi que 35 dos 108 pacientes infectados e tratados com praziquantel, isto é 94% não apresentavam mais o antígeno 6 a 12 meses depois do tratamento, havendo uma grande redução do antígeno nos demais pacientes. Este aspecto particular foi corroborado experimentalmente em camundongos pelo mesmo grupo de pesquisadores (Carter e cols., 1990). Levando em consideração estes dados, os autores propõem que o teste de ELISA utilizando esta proteína "heat shock" 70 pode ser útil na diferenciação de infecções passadas e presentes.

Levando em consideração os dados acima mencionados, os objetivos básicos deste trabalho foram: 1) produzir anticorpos monoclonais contra antígenos ovulares solúveis do S. haematobium utilizando a tecnologia do hibridoma; 2) identificar possíveis antígenos esquistossomóticos espécie e estágio-específicos que possam ser utilizados em imunodiagnóstico e imunoprevenção e 3) caracterizar, pelo menos parcialmente, tais antígenos do ponto de vista imunológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARASITAS

Os parasitas foram obtidos de hamsters (Mesocricetus auratus), LVG dourados, infectados pelo S. haematobium oriundos da Universidade de Lowell, Massachussets, EUA, Dr. Liang (Laboratório de Malacologia Médica). Os animais foram infectados com 350 cercárias de S. haematobium cepa Egito, por via cutânea, sob anestesia com pentobarbital sódico administrado por via subcutânea. Quatro meses após a infecção, os hamsters foram sacrificados e perfundidos de acordo com o método de Duvall e DeWitt (1967). Grupos de vermes machos e fêmeas foram separados usando-se um microscópio de dissecação, sendo os vermes mantidos numa placa de Petri contendo meio de perfusão sem heparina, sobre gelo úmido.

Os ovos dos parasitas foram obtidos dos intestinos delgados de hamsters infectados, através de homogeneização em salina a 1,7 %, usando-se um liquidificador comercial marca Ware. Antes da homogeneização, os intestinos foram liberados do mesentério e abertos, tendo-se removido todo o conteúdo fecal, lavando-se a mucosa com NaCl a 1,7 %. O homogenato foi parcialmente depurado através de sedimentação e decantação como descrito por Coker e von Lichtenberg (1956). Os ovos foram separados de tecido intestinal residual procedendo-se centrifugação num gradiente contínuo de Percoll a 40 % (Pharmacia-LKB, Piscataway, Nova Jersey, EUA) em NaCl a 1,7 %, durante 15 minutos, a 300 g, conforme descrito por Lazdins e cols. (1982), com pequenas modificações. Os ovos assim purificados foram lavados para remoção do Percoll através de centrifugação em salina a 1,7 %, três vezes, durante três minutos cada vez, a 250 g e, então, ressuspensos em solução salina tamponada (PBS), sendo, então, processados para preparação de antígeno logo a seguir. Caso o antígeno não fosse preparado imediatamente, a suspensão de ovos em PBS era centrifugada, removendo-se o líquido, sendo o material congelado num freezer a -70°C.

Cercárias de S. haematobium foram obtidas através de esmagamento de caramujos Bulinus truncatus infectados provenientes da Universidade Lowell (Dr. Liang). Os caramujos esmagados foram, então, expostos a luz e calor; as cercárias emergidas dos tecidos foram coletadas e usadas dentro de três horas. Cercárias de S. japonicum e de S. mansoni e, raramente, de S. haematobium foram obtidas por eliminação espontânea quando os caramujos infectados eram expostos a luz e calor.

A cepa Porto Rico do S. mansoni era mantida em laboratório usando-se caramujos Biomphalaria glabrata e camundongos CBA/J, (Laboratórios Jackson, Bar Harbor, ME) como descrito por Harn e cols. (1984), e serviu de fonte de matéria prima para a preparação de SWAP e SEA.

3.2 ANTÍGENOS

Os antígenos solúveis dos vermes adultos macho e fêmea (SWAP) e os antígenos ovulares solúveis (SEA) foram preparados após homogeneização dos vermes e/ou ovos purificados sobre gelo úmido, em PBS, sem inibidores de proteases, usando-se um homegeneizador de vidro (marca Wheaton), sendo o material homogeneizado a cada cinco minutos, durante uma hora, sempre sobre gelo úmido. Após este processamento, o homogenato foi centrifugado a 15000 g durante 60 minutos, a 4°C, em microcentrifuga (marca Eppendorf, modelo 5415). Os sobrenadantes foram coletados e considerados como SWAP e SEA, aliquotados e estocados a -70°C até o momento do uso.

SEA de cepas chinesa ou filipina de S. japonicum foram obtidas de preparações liofilizadas de vermes e ovos provenientes da Universidade de Medicina de Shanghai, República Popular da China ou do Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) da UNDP/Banco Mundial/OMS. Vermes adultos do S. haematobium foram obtidos através da perfusão dos hamsters infectados e o antígeno SWAP preparado de acordo com a técnica já mencionada.

A concentração proteica relativa dos vários extratos foi determinada pela técnica de ligação ao corante "coomassie blue" (Bradford, 1976), usando-se um kit de mensuração proteica da Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, California, EUA).

3.3 PRODUÇÃO DE HIBRIDOMAS SECRETORES DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-OVO

Camundongos Balb/C, fêmeas, com 6-8 semanas de idade (Laboratórios Jackson) foram inicialmente imunizados por via intra-peritoneal com injeções de 100 ug de SEA de S. haematobium emulsionado com adjuvante de Freund completo, numa proporção 1:3, respectivamente. Após quatro semanas, os animais foram re-imunizados com injeção intra-peritoneal de 75 ug de SEA misturado a adjuvante de Freund incompleto, numa proporção de 1:3, respectivamente. Quatro dias após o reforço imunizante, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e os seus baços removidos; antes do sacrifício foi colhido sangue do plexo peri-orbitário para separação de soro usado como soro de animal imunizado nos experimentos realizados.

As células esplênicas foram fusionadas com células mielomatosas murinas SP2 de acordo com o protocolo de Kennet e cois. (1978), usando-se polietileno glicol 1500 (Boehringer-Mannheim, Indianápolis, IN) como agente de fusão. Esta técnica consistiu no seguinte: após a remoção do baço, este era colocado e lavado numa placa de Petri de 60 cm³ contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com gentamicina a 0,02% (meio de lavagem), as quais se imprimiu um movimento giratório suave, sendo esta operação repetida por sete vezes, em diferentes placas de Petri. O baço, foi então, dilacerado usando-se pinças retas, pontiagudas e delicadas, com a finalidade de se liberar as células esplênicas para a suspensão. Esta suspensão celular foi transferida para um tubo cônico, estéril, de 15 ml onde os grandes fragmentos teciduais sedimentaram em aproximadamente dois minutos. O sobrenadante foi então transferido para outro tubo cônico de 15 ml e centrifugado a 300 g durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Após esta etapa, o sobrenadante foi desprezado e as células re-suspendidas

em um ml de cloreto de amônio a 0,85%, durante dois minutos com a finalidade de lisar as hemácias. Ao final deste período, acrescentou-se o meio de lavagem para completar 15 ml e a suspensão celular esplênica foi novamente lavada através de centrifugação a 300 g, durante 10 minutos. Finda esta etapa, o sobrenadante foi desprezado e as células re-suspendidas no meio de lavagem, sendo o volume ajustado para 10 ml. Procedeu-se, então, a contagem das células esplênicas, utilizando-se uma diluição a 1:10 com Azul Tripan a 0,4%, em PBS, usando-se uma hemocitômetro de Newbauer (normalmente são obtidas 5×10^7 - 1×10^8 células por baço). Paralelamente, foram contadas as células mielomatosas murinas SP2, as quais posteriormente foram misturadas às células esplênicas, numa proporção de 1:10, respectivamente, ou seja 1 célula mielomatososa para 10 células esplênicas. Tal mistura fora, então, centrifugada conforme descrito, sendo aspirado o sobrenadante até o "pellet" celular. Este "pellet" da mistura celular (células mielomatosas e esplênicas) fora resuspendido através de agitação mecânica digital, acrescentou-se a mistura de fusão, 0,4 ml de polietilenoglicol (PEG) 1500, sendo a mistura celular centrifugada durante 5-6 minutos, a 300 g, em temperatura ambiente. O período de exposição ao PEG 1500 (2g em 4ml de HEPES 75mM) não deve exceder sete a oito minutos. Após a centrifugação, aspirou-se todo o meio de fusão, sendo as células gentilmente re-suspendidas em meio de lavagem. O volume final foi obtido acrescentando-se DMEM contendo hipoxantina e timidina (DMEM-HAT), sendo plaqueadas 200.000 a 300.000 células por pocinho em placas de cultura com 96 poços, de fundo chato, marca Corning. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C, numa atmosfera de 7,5% de gás carbônico. Após 12 a 16 horas de incubação, acrescentou-se 20 μ l de meio DMEM-HAT contendo hipoxantina e timidina (1X concentradas) e aminopiterina (2X concentrada) que seleciona as células híbridas. Sete dias depois, as células foram alimentadas com DMEM-HAT. Os hibridomas secretores de anticorpos monoclonais estágio e espécie-específicos foram, imediatamente, clonados através de diluição limitante, usando-se células SP2 irradiadas com 1500 rads como células alimentadoras. Os sobrenadantes de hibridomas clonados foram a fonte de todos os

anticorpos monoclonais, e depois de separados das células híbridas foram aliqüotados e mantidos no freezer a -70°C.

3.4 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Os sobrenadantes de cultura de hibridomas foram usados para identificar anticorpos contra SEA de S. haematobium, S. mansoni ou S. japonicum ou contra SWAP de vermes macho ou fêmea do S. mansoni e do S. haematobioi através do ELISA. Placas flexíveis de cloreto de polivinila com 96 poços (Falcon, Oxnard, CA) foram sensibilizadas com 50 ul de antígeno na concentração de 10 ug/ml e incubados em câmara úmida durante 16 horas, a 4°C. As placas foram bloqueados através de quatro lavagens sucessivas de 10 minutos cada, usando-se uma solução de PBS contendo 0,3 % de Tween 20. Após o bloqueio, as placas foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween 20 (PBS-T-solução de lavagem), 5 minutos cada vez. As placas foram, então, incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas, sem diluição, (50 ul por pocinho), utilizando-se como controle positivo o soro dos camundongos imunizados com SEA e Adjuvante de Freund, diluído a 1:400, em PBS-T 0,05%, e, como controles negativos, soro de camundongo Balb/C normal, diluído de modo idêntico, além de sobrenadante de células mielomatosas murinas não secretoras SP2, durante 45 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após quatro lavagens com PBS-T, conforme já descrito, as placas foram cobertas com 50 ul de anticorpo de cabra anti-IgM e anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (Boehringer-Mannheim, INDIANAPOLIS, IN) diluído a 1:800 em PBS-T 0,05% e, então, incubadas por 45 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após quatro lavagens com PBS-T, as placas foram reveladas usando-se tetrametilbenzidina (TMB) (Kirkegaard and Perry, Baltimore, MD). A reação foi interrompida com ácido fosforico 1 M e as densidades ópticas foram determinadas usando-se um leitor de ELISA Bio-Tek EL-7 (Bio-Tek, Vermont) acoplado com um filtro de 450 nm.

3.5 ANÁLISE DA ISOTIPAGEM DE IMUNOGLOBULINAS

Os sobrenadantes das culturas de hibridoma foram testados para isotipos de imunoglobulinas usando-se um "kit" de ELISA para subtipagem de imunoglobulinas (Boehringer-Mannheim, INDIANAPOLIS, IN). Foram pesquisadas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e as cadeias leves kapa e lambda, sendo seguido o protocolo de ELISA recomendado pelo fabricante.

3.6 ANÁLISE DOS PESOS MOLECULARES DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS

Os pesos moleculares aproximados dos antígenos espécie/estágio-específicos foram determinados através da análise de Imuno-Western blot, uni e bidimensional, Towbin e cols. (1982). Além disso, estes experimentos foram usados para confirmar os resultados do ELISA sobre a espécie/estágio-especificidade dos anticorpos monoclonais, testando-os contra antígenos ovulares solúveis do S. mansoni, S. haematobium e S. japonicum e contra os antígenos solúveis de verme adulto do S. mansoni e S. haematobium. A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS uni-dimensional foi realizada de acordo com Laemmli (1970), usando-se tampão de amostra não reduzido e também reduzido (mercaptoetanol a 5% e ureia 5M); foi utilizado um gel de corrida de acrilamida a 10% e um gel de aplicação a 3,5%. A eletroforese foi feita em temperatura ambiente (25° C), usando-se 150-200 volts, 25-30 mA, sob corrente constante, durante 3 a 4 horas, com resfriamento contínuo do tampão de corrida. As amostras antigênicas foram desnaturadas por ebulição durante 3 minutos, resfriadas e, então, aplicadas. Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS bidimensional foi realizada de acordo com a técnica descrita por O'Farrell e cols. (1975). A primeira dimensão da eletroforese bidimensional foi realizada em tubos de vidro medindo 12 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro, utilizando-se gel de poliacrilamida a 10% ao qual se acrescentava uma mistura de anfolitos que

assegurava ao gel um gradiente de pH variando de 3-10, o que permitiu a separação da amostra antigênica pelo foco isoeletrico, em vez que, expostas a tampões anódico (H_3PO_4 0,01M) e catódico (NaOH 0,02M), as diferentes amostras antigênicas migram no gradiente de pH estabelecido, até atingirem os seus pontos isoeletricos, sendo assim fracionadas. Finda esta primeira dimensão, o gel em forma de bastão teve o pH medido em toda a sua extensão, utilizando-se um eletrodo especial plano. Após tal aferição, o gel foi equilibrado em solução tampão de amostra com SDS e, rapidamente, congelado neste tampão e estocado em freezer a -70°C . A segunda dimensão foi realizada colocando-se o gel em forma de bastão (primeira dimensão) sobre um gel de corrida (acrilamida a 10%), procedendo-se como já referido anteriormente quando da descrição da metodologia para eletroforese. A transferência de antígeno dos geis provenientes tanto da eletroforese unidimensional como da eletroforese bidimensional foi feita imediatamente para membrana de nitrocelulose (NCP) com 0,1 μm (Schleicher and Schuell, Keene, NH), durante 14-16 horas, a 30 volts, 0,1A, a 4 C. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada/bloqueada através de incubação em PBS contendo 0,3% de Tween 20, durante uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação suave e constante, depois lavados duas vezes em PBS-T a 0,05%. A membrana de nitrocelulose lavada e bloqueada foi cortada em tiras de 0,3 cm de largura e 16 cm de comprimento e incubado com sobrenadantes de hibridoma, sobrenadante de células SP2, soro de camundongo normal e soro de camundongo imunizado, colocados em tubos individualizados, durante duas horas, a temperatura ambiente, sob agitação constante e moderada. Os sobrenadantes de hibridoma e de células SP2 foram usados sem diluição e os soros de camundongos normais e imunizados diluídos a 1:400 em PBS-T a 0,05%. Após a incubação, as tiras de membrana de nitrocelulose foram lavadas 4 X com PBS-T a 0,05%, 10 minutos cada vez, e então incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo de cabra anti-IgG e anti-IgM de camundongo conjugado com peroxidase (Boehringer-Mannheim) diluído a 1:800 em PBS-T 0,05%. Após 4 lavagens com PBS-T, as bandas foram visualizadas pela incubação das tiras de NCP com a solução de tetracloreto de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em PBS, 0,5 mg/ml

e peróxido de hidrogênio a 30%, 0,6µl/ml de PBS. A reação foi interrompida pela lavagem das tiras em água destilada por cinco vezes, uma a dois minutos cada vez. Sempre que necessário, os geis eram impregnados pela prata para visualização das bandas antigênicas de acordo com a técnica de Wray e cols. (1981).

3.7 SENSIBILIDADE DOS EPITOPOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS AO METAPERIODATO DE SÓDIO

A oxidação de SEA pelo metaperiodato de sódio (NaIO_4) foi realizada após sensibilização de placas flexíveis de cloreto de polivinila com o antígeno ou após transferência do antígeno via "western blot" para membrana de nitrocelulose, de acordo com o protocolo de Woodward e cols. (1985). Depois que as placas ou as tiras de membrana de nitrocelulose foram lavadas e bloqueadas em PBS com 0,3% de Tween, foram lavadas rapidamente com solução tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 4,5. Os poços ou tiras de membrana de nitrocelulose foram, então, tratados com várias concentrações (0-40mM) de metaperiodato de sódio durante uma hora, a 23°C, e mantidos em ambiente escuro. As placas ou tiras foram então lavadas com tampão acetato de sódio 50 mM e incubadas por 30 minutos com solução de borohidrato de sódio, 50 mM. Os poços e tiras foram, então, lavados com PBS-T e os testes de ELISA ou "imunoblots" realizados como descrito anteriormente.

3.8 ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS DO S. haematobium

Os antígenos ovulares solúveis do S. haematobium foram fracionados através de SDS-PAGE, em condições não redutoras. As duas bandas antigênicas (peptídeos) reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 2D14E8, com pesos moleculares aproximados de 64 e 66 kDa, foram eletroforéticamente transferidos para membrana de nitrocelulose,

de acordo com a mesma técnica já mencionada. As duas bandas peptídicas acima mencionadas foram cortadas da membrana de nitrocelulose e individualizadas, lavadas em água Milli-Q e encaminhadas ao Departamento de Microquímica da Universidade Harvard (Dr. William Lane) para os estudos de composição e sequenciamento de aminoácidos. O material que fora transferido do gel de poliacrilamida estava restrito a 0,75 cm² de membrana. Dez por cento de cada peptídeo encaminhado foram separados para realização de análise de aminoácidos através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) de fase reversa. Os restantes 90% dos peptídeos foram submetidos a processos químicos destinados ao sequenciamento de aminoácidos. O sequenciamento do segmento NH₂ terminal mostrou que ambas as proteínas estavam bloqueadas, dificultando a obtenção do sequenciamento de aminoácidos. O material em membrana de nitrocelulose foi, então, submetido a digestão com tripsina, para liberação do bloqueio. Os peptídeos trípticos resultantes foram, então, separados por HPLC "narrow bore" de fase reversa e submetidos a um sequenciador de aminoácidos de fase gasosa, de acordo com Aebersold e cols., 1987. A seqüência de aminoácidos de dois peptídeos trípticos distintos foi assim obtida. Tais seqüências de aminoácidos foram então analisadas com respeito ao grau de homologias com outras seqüências de proteínas conhecidas através de um programa computadorizado Fastp. para triagem de seqüências de peptídeos.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS

A triagem inicial dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas para a detecção de anticorpos anti-antígenos ovulares solúveis do S. haematobium resultou na identificação de 24 amostras positivas de um total de 100 hibridomas testados. Uma triagem secundária, para testar a espécie-especificidade, foi realizada frente o SEA do S. mansoni e de S. haematobium. Foi verificado que 09 dos 24 hibridomas originais produziam anticorpos espécie-específicos de acordo com este teste ELISA. Os nove hibridomas que foram inicialmente aceitos como espécie-específicos foram clonados através da técnica da diluição limitante e, então, re-testados para especificidade através do ELISA. Este terceiro ELISA também incluiu SEA do S. japonicum e mostrou que existiam quatro clones diferentes produzindo anticorpos monoclonais espécie-específicos para o S. haematobium (Tabela I). Estes sobrenadantes de hibridomas clonados foram a seguir testados para reação com SWAP macho e fêmea do S. haematobium via ELISA. Como e mostrado na Tabela I, todos os clones foram estágio-específicos para antígenos ovulares assim como foram espécie-específicos para S. haematobium. Os clones de hibridomas relevantes foram: 2D1 4E8, 2B3 5C11, 3E2 5F7 e 3E6 4B9.

4.2 ANÁLISE DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS ATRAVÉS DE "WESTERN BLOT"

Usando-se os antígenos ovulares solúveis do S. haematobium, nesta técnica, o anticorpo monoclonal 2D14E8 reconheceu duas bandas antigênicas bem definidas, com mobilidades relativas (Mrs) aproximadas de 66 e 64 kDa, sob condições redutoras e não redutoras. Os anticorpos monoclonais 2B35C11, 3E25F7 e 3E64B9 reconheceram um grupo de bandas antigênicas pouco definidas com Mrs de 40, 43, 64, 66, 97, 116 e 200 kDa sob condições não redutoras (Figura 1). Quando o SEA foram submetidos a

eletroforese sob condições redutoras, a habilidade desses três anticorpos em detectar tais bandas antigênicas distintas tornou-se muito mais difícil (Figura 2).

Utilizamos esta mesma técnica para confirmar a espécie/estágio-especificidade dos anticorpos monoclonais diante de antígenos solúveis de verme adulto do S. haematobium e S. mansoni. Verificou-se que os nossos anticorpos monoclonais não reconheceram bandas antigênicas (dados não mostrados).

A análise do "Western blot" bi-dimensional dos antígenos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 mostrou que cada uma das bandas antigênicas com pesos moleculares de 64 e 66 kDa estava compostas por um certo número de isomorfos (Figura 3). Um grupo de, aproximadamente, oito isomorfos tinha pontos isoelétricos (pis) variando de 4,8 - 6,1. Um segundo grupo de aproximadamente 11 isomorfos tinha pls variando de 6,7 - 7,5 (Figura 3).

4.3 SENSIBILIDADE DOS EPITOPOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS AO METAPERIODATO DE SÓDIO

Para melhor caracterizar os antígenos espécie/estágio-específicos, foram realizados testes para verificar se algum dos epitopos era sensível ao tratamento com várias concentrações de metaperiodato de sódio (0 a 40 mM). Esta análise foi efetuada pelas técnicas de ELISA e Western blot. Os resultados dos ELISA mostraram que os epitopos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 foram resistentes ao tratamento com todas as concentrações de metaperiodato. Em contraste, os epitopos reconhecidos pelos anticorpos 3E25F7 e 3E64B9 foram bastante sensíveis ao tratamento com concentrações mínimas de metaperiodato de sódio como 1mM (Figura 4).

O tratamento do SEA transferido para a membrana de nitrocelulose (Imuno-"western blot") com metaperiodato de sódio confirmou os resultados do ELISA (Figuras 5 e 6). Os imunoblots realizados com o anticorpo monoclonal 2D14E8 não mostraram diferenças na habilidade do monoclonal em reconhecer os antígenos com 66 e 64 kDa

depois do tratamento com metaperiodato de sódio, mesmo com concentrações altas como 40 mM. O Western blot também mostrou que os epitopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais 3E25F7 e 3E64B9 foram alterados com concentrações baixas de metaperiodato de sódio como 0,1 mM, sendo a ligação dos anticorpos aos antígenos praticamente abolida (Figuras 5 e 6).

4.4 ANÁLISE E DETERMINAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS ANTÍGENOS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS DO S. haematobium

A análise de aminoácidos das duas bandas antigênicas de pesos moleculares em torno de 64 e 66 kDa, reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 2D14E8, revelou presença dos mesmos aminoácidos identificados como: ASX, GLX, SER, GLY, HIS, ARG, THR, ALA, PRO, TYR, VAL, MET, PECYS, ILE, LEU, PHE, LYS. A seqüência de aminoácidos do primeiro peptídeo tríptico (SH64B-NT72) revelou 14 resíduos com a seguinte ordem:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

M A V I T V P A Y F N D S Q.

A seqüência de aminoácidos do segundo peptídeo tríptico (SH64B-NT57) revelou 13 resíduos com a seguinte ordem:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

T T P S Y V A F T D A E R.

De posse dessas informações, colocamos tais dados de sequenciamento de aminoácidos dos dois peptídeos trípticos num banco de dados computadorizado Fastp., para detecção de homologias nas seqüências de aminoácidos com as seqüências de outras proteínas e peptídeos conhecidas. Foi verificado que ambas as seqüências dos peptídeos eram completamente homólogas com porções da proteína "heat-shock" ou proteína de estresse com peso molecular 70 kDa; essa homologia foi de 89,7% e 79,1% para os primeiro e segundo peptídeos trípticos, respectivamente. Até agora, não se obteve no experimento seqüência de aminoácidos de alguma possível região específica para o esquistossoma.

4.5 ISOTIPAGEM DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPÉCIE/ESTÁGIO-ESPECÍFICOS PRODUZIDOS

Esta análise revelou que os anticorpos monoclonais 2D14E8, 2B35C1, 3E25D3 e 3E64B9 são imunoglobulinas do tipo G1. A avaliação das cadeias leve mostrou que o anticorpo monoclonal 2D14E8 é do tipo kapa e os outros três do tipo lambda (Tabela II).

TABELA I

ESTÁGIO ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS ANTI-OVO
Schistosoma haematobium

Anticorpos monoclonais	D.O. em 450 nm				
	<u>S.h</u> SEA	<u>OS.m</u> SWAP	<u>OS.h</u> SWAP	<u>OS.m</u> SWAP	<u>OS.h</u> SWAP
2D1 4E8	1,047	0,006	0,000	0,005	0,041
2B3 5C11	1,082	0,006	0,000	0,000	0,038
3E2 5D3	1,359	0,001	0,037	0,001	0,037
3E6 4B9	1,391	0,003	0,000	0,003	0,007

D.O. - Densidade óptica; S.h - S. haematobium

S.m - S. mansoni; S.j - S. japonicum;

SEA - Antígenos ovulares solúveis

SWAP - Antígenos solúveis do verme adulto

TABELA II

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS PRODUZIDOS CONTRA SEA DO
Schistosoma haematobium**

Anticorpo Monoclonal	Isotipo	Cadeia leve	D.O. em 450 nm		
			<u>S. h</u> SEA	<u>S. m</u> SEA	<u>S. j</u> SEA
2D1 4E8	IgG1	kapa	1,047	-0,070	0,123
2D1 2F4	IgG1	kapa	0,913	-0,089	0,080
2B3 5C11	IgG1	Lambda	1,082	0,000	0,103
2B3 3G7	IgG1	Lambda	1,052	-0,156	0,103
2E2 5D3	IgG1	Lambda	1,359	-0,056	0,161
3E2 5F7	IgG1	Lambda	1,335	-0,052	0,065
3E6 4B9	IgG1	Lambda	1,391	-0,027	0,077
3E6 4E9	IgG1	Lambda	1,429	-0,071	0,054
S P 2	-	-	0,048	0,002	0,008
SCI (Sh)*	-	-	2,000	-	-
SCC (Sm)**	-	-	-	1,986	-
SCC (Sj)***	-	-	-	-	1,900

(*) Soro de camundongo imunizado com SEA do S. haematobium

(**) Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. mansoni

(***) Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. japonicum

SP2 - Sobrenadante de cultura de células SP2

SEA - Antígenos ovulares solúveis; D.O. - Densidade óptica

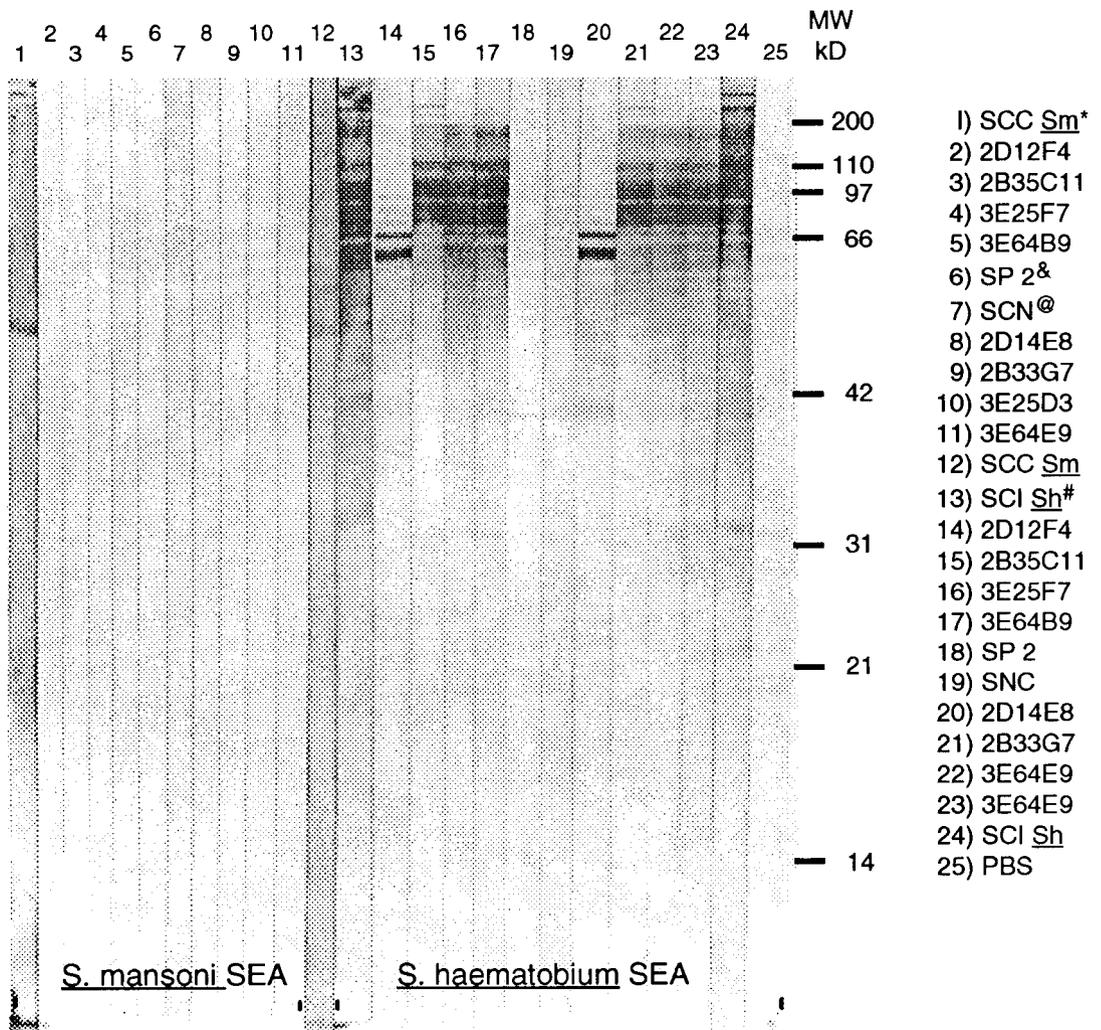


Fig. 1. Análise do Imuno-Western blot dos anticorpos monoclonais contra os antígenos ovulares solúveis (SEA) do S. haematobium e do S. mansoni em condições **não** redutoras.

*SCC Sm - Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. mansoni

&SP2 - Sobrenadante de cultura de células SP2

@SCN - Soro de camundongo normal

#SCI Sh - Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. haematobium

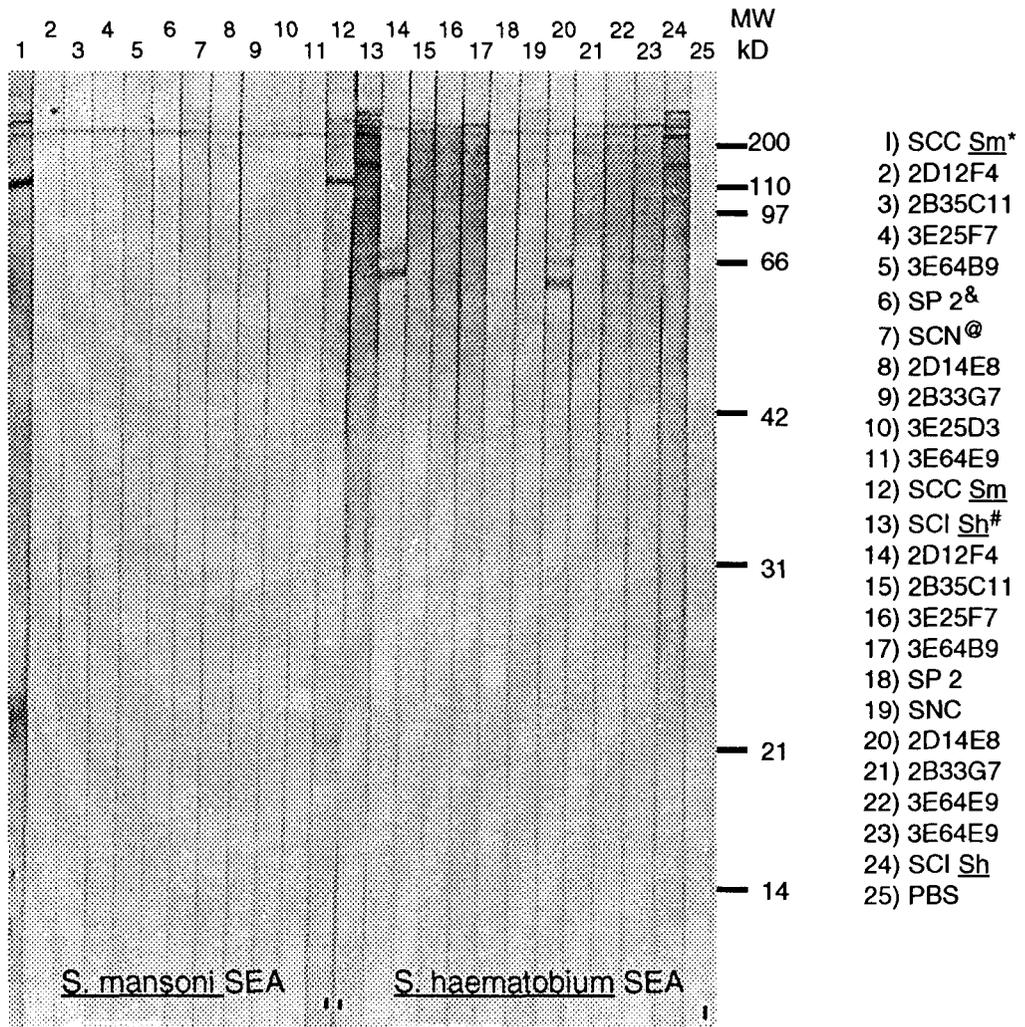


Fig. 2. Análise do Imuno-Western blot dos anticorpos monoclonais contra os antígenos ovulares solúveis (SEA) do S. haematobium e do S. mansoni em condições redutoras.

*SCC Sm - Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. mansoni

&SP2 - Sobrenadante de cultura de células SP2

@SCN - Soro de camundongo normal

#SCI Sh - Soro de camundongo cronicamente infectado pelo S. haematobium

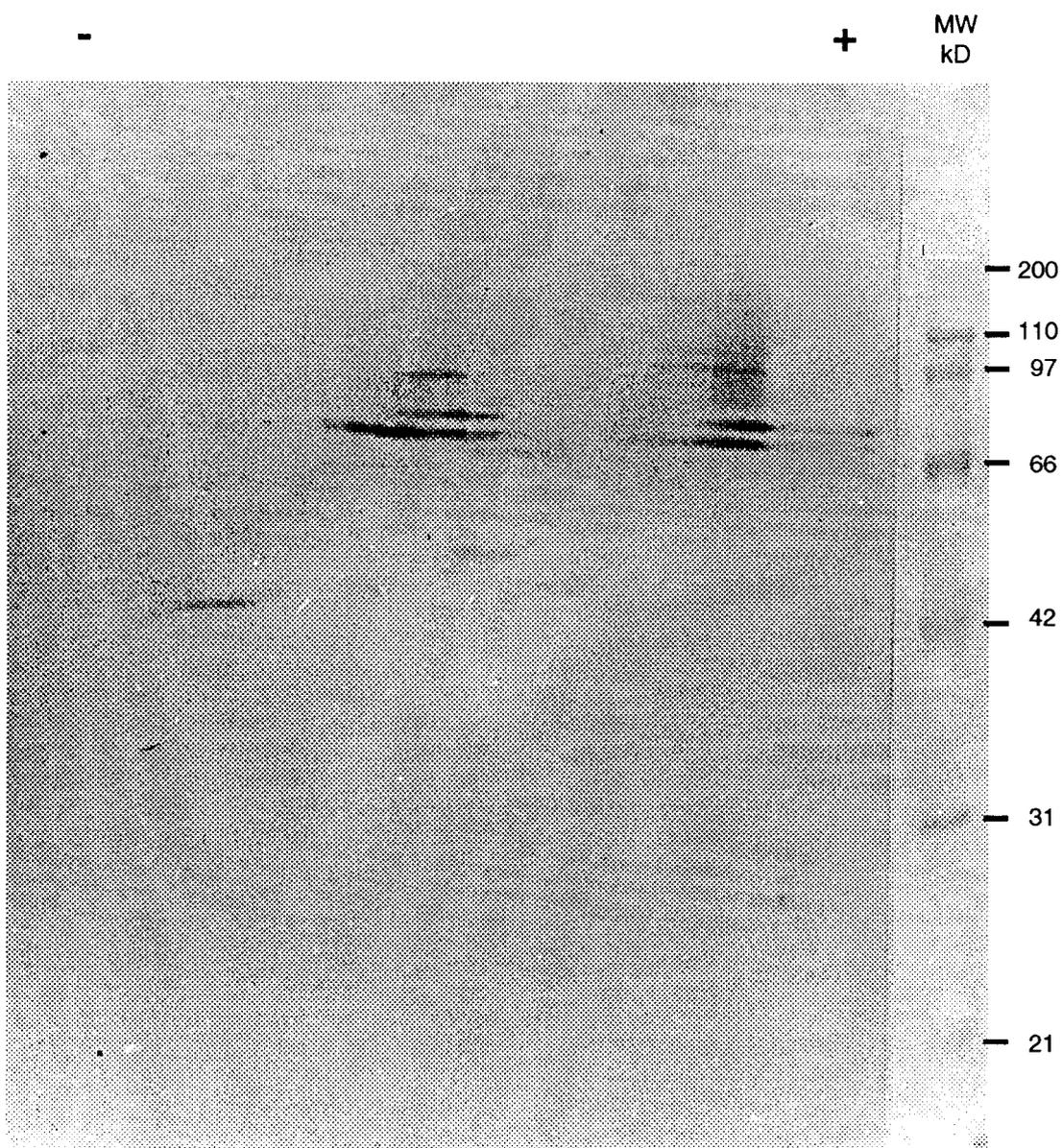


Fig. 3. Análise do Imuno-Western blot bi-dimensional do anticorpo monoclonal 2D1 4E8 contra os antígenos ovulares solúveis (SEA) do S. haematobium.

OXIDAÇÃO DO SEA DO *S. haematobium* Tratamento com o metaperiodato de sódio

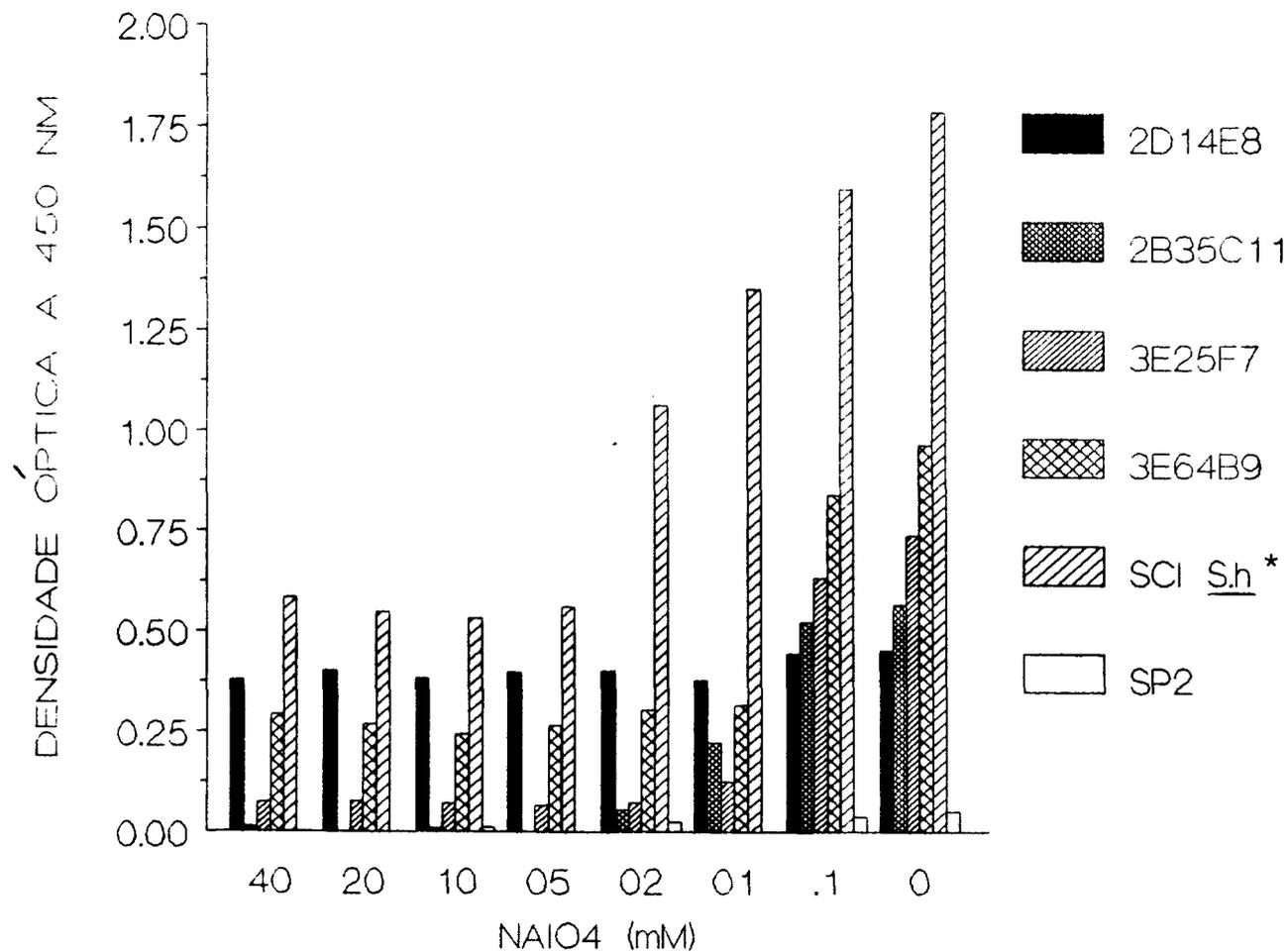


FIGURA 4

* SCI S.h - Soro de camundongo imunizado com SEA do *S. haematobium*

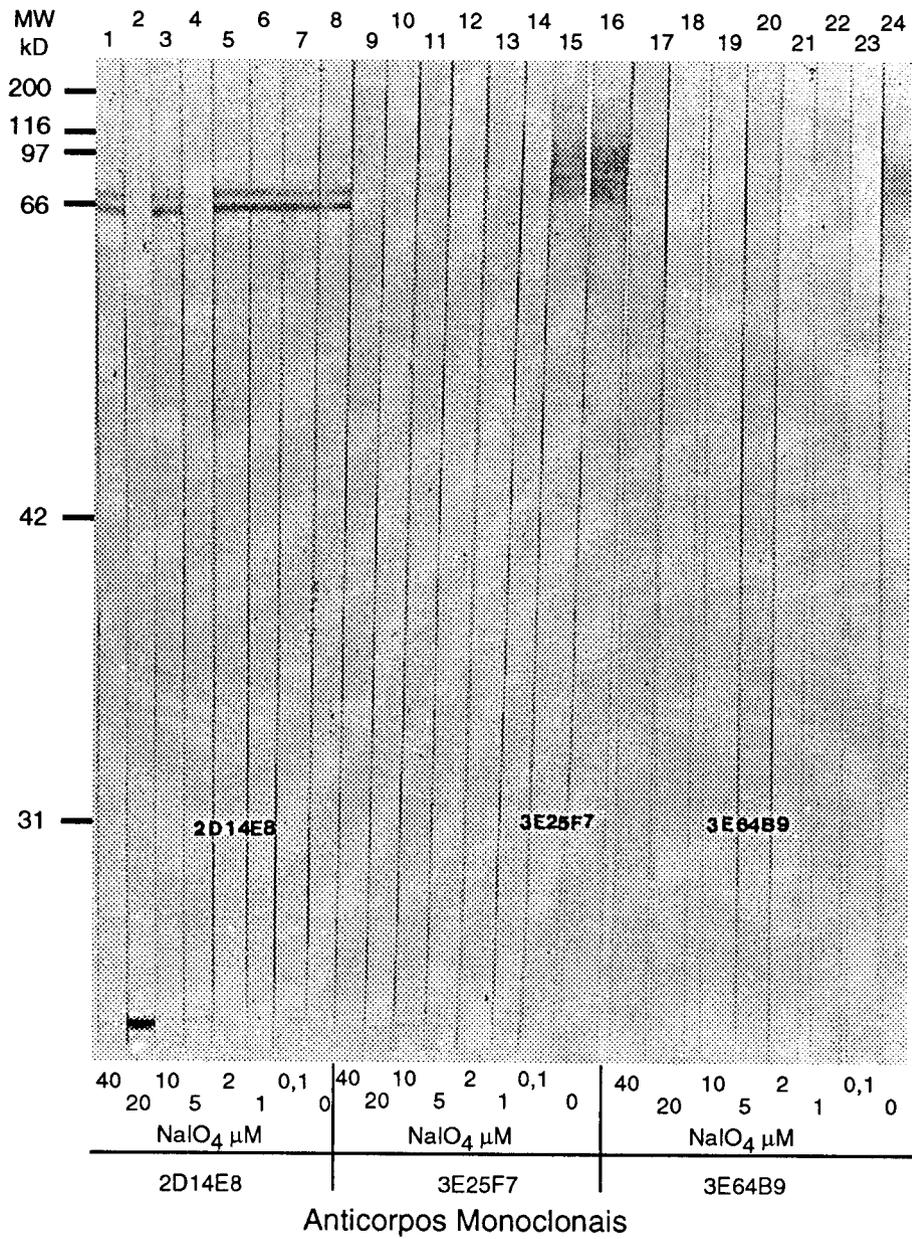
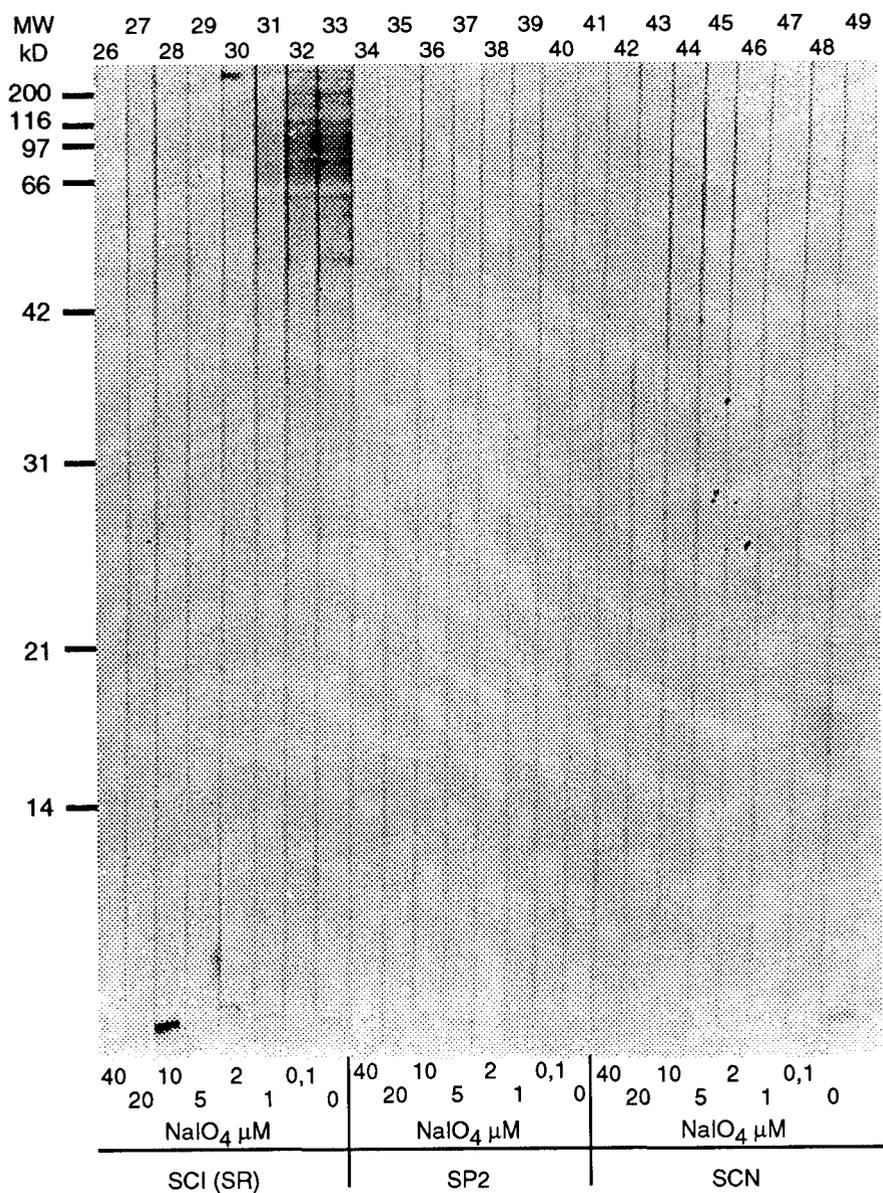


Fig. 5. Sensibilidade ao metaperiodato de sódio (NaIO_4) dos epitopos dos antígenos ovulares solúveis (SEA) do *S. haematobium* reconhecidos pelos anticorpos monoclonais espécie/estágio-específicos (análise do Imuno-Western blot).



Anticorpos Monoclonais

SCI (SR) - Soro de camundongo imunizado com SEA do S. haematobium

SP2 - Sobrenadante de cultura de células de SP2

SCN - Soro de camundongo normal

Fig. 6. Sensibilidade ao metaperiodato de sódio (NaIO₄) dos epitopos dos antígenos ovulares solúveis (SEA) do S. haematobium reconhecidos pelos anticorpos monoclonais espécie/estágio-específicos (análise do Imuno-Western blot). (Continuação).

5 DISCUSSÃO

Estamos interessados em contribuir para o melhor entendimento da relação hospedeiro-parasita no campo da esquistossomose, e estudar o papel de possíveis antígenos espécie/estágio-específicos do S. haematobium no que se refere a imunodiagnóstico, levando em consideração a sensibilidade e especificidade das reações sorológicas baseadas em tais antígenos, além da possível utilização de tais antígenos em imunoprevenção. A tecnologia do anticorpo monoclonal têm-se mostrado uma arma poderosa para a análise e isolamento de epítopos específicos do complexo mosaico antigênico dos parasitas.

No presente estudo, relata-se a produção de anticorpos monoclonais murinos que reconhecem epítopos do S. haematobium espécie e estágio-específicos. Os híbridos foram produzidos em camundongos imunizados com antígenos ovulares solúveis e cada anticorpo monoclonal foi caracterizado como ovo-específico como demonstrado pelos testes de ELISA e de imuno-"Western blot" (Figuras 1 e 2; Tabela I). A comparação da seqüência de aminoácidos de dois diferentes peptídeos trípticos da banda antigênica reconhecida pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 em membrana de nitrocelulose com outras seqüências de proteínas conhecidas revelou, nos dois peptídeos, uma homologia com a proteína heat-shock 70 de várias espécies animais, incluindo o homem e o S. mansoni.

Este trabalho contribui para a identificação de antígenos do S. haematobium que são espécie-específicos e que também só foram detectados nos ovos dos parasitas, sendo também estágio-específicos.

O fato desses anticorpos aqui produzidos não reconhecerem antígenos da mistura antigênica de vermes adultos fêmeas (SWAP) foi interessante pois vermes do sexo feminino contêm ovos em desenvolvimento assim como glândulas produtoras de material que compõem a casca e de material vitelínico. A nossa impossibilidade em detectar esses antígenos em vermes fêmeas pode, simplesmente, ser explicada pela sensibilidade dos testes empregados. Por outro lado, vermes adultos fêmeas podem não possuir tais

antígenos pois eles as vezes se relacionam à maturação de mirácidios e, assim, terem a sua expressão regulada pelo seu desenvolvimento.

Os resultados de outros investigadores sugerem que vários antígenos esquistossomóticos espécie-específicos são preferencialmente encontrados entre os antígenos ovulares. McLaren e cols. (1978) e Ruiz-Tiben e cols. (1979) mostraram que antígenos ovulares foram mais sensíveis que outros antígenos encontrados em outros estágios parasitários para o sorodiagnóstico de infecção pelo S. mansoni. Hillyer e Pacheco (1986) relataram a existência de um antígeno de 40 kDa considerado espécie-específico do S. haematobium e derivado dos antígenos ovulares. Estes autores mostraram que esta banda antigênica apresentou uma migração difusa característica de uma glicoproteína. Hamburguer e cols. (1982) identificaram uma glicoproteína derivada do ovo do S. haematobium com 70 kDa a que denominaram MEGL-H. Esta glicoproteína foi consistente e fortemente reativa com uma mistura de soros de pacientes com esquistossomose hematobia, sendo também demonstrada uma limitada reação cruzada deste antígeno com componentes antigênicos de ovos do S. mansoni. Não demonstraram, todavia, se este antígeno era, também, estágio-específico. Norden e Strand (1984), tentando identificar glicoproteínas gênero e espécie-específicas derivadas dos ovos de S. haematobium, S. japonicum e S. mansoni, verificaram que, embora existam alguns antígenos ovulares gênero e espécie-específicos, a maioria das glicoproteínas ovulares apresentava reação cruzada. Todavia, tais autores identificaram um antígeno de 70 kDa derivado de glicoproteínas ovulares assim como alguns outros epitopos que foram considerados gênero e/ou espécie-específicos; contudo, a estágio-especificidade não foi determinada.

Recentemente, Jonge e cols. (1989) obtiveram um anticorpo monoclonal contra o antígeno circulante anódico (CAA) do S. mansoni, um proteoglicano derivado do intestino dos vermes adultos, com peso molecular de 70 kDa e que os autores relatam como sendo um antígeno homólogo a proteína "heat-shock" 70. Usando este anticorpo monoclonal, eles detectaram o CAA na urina de pacientes infectados com S. haematobium ou S. mansoni. Por outro lado, demonstraram que títulos de CAA correlacionaram-se

positivamente com o número de ovos de S. mansoni excretados nas fezes, mas tais títulos de CAA não demonstraram uma correlação significativa com o número de ovos de S. haematobium na urina.

Fu e Carter (1990) também detectaram uma banda antigênica de 70 kDa homóloga da proteína "heat-shock" do S. japonicum no soro de seres humanos infectados pelo S. japonicum nas formas aguda e crônica, utilizando um anticorpo monoclonal que reconhecia tal antígeno tanto nos vermes adultos como nos ovos. Neste trabalho, utilizando o método de ELISA, o soro de 93 dos 95 pacientes com a forma crônica da parasitose foi positivo para este antígeno e 12 dos 13 soros de pacientes com a forma aguda foram também positivos. A pesquisa deste mesmo antígeno foi feita em 35 pacientes cronicamente infectados, seis a doze meses após o tratamento com praziquantel, e revelou-se negativa em 33 desses pacientes. Os autores ressaltaram a possível validade deste teste de ELISA com este antígeno na distinção de infecções passadas e presentes.

Até agora, os antígenos esquistossomóticos homologos à proteína "heat-shock" têm-se revelado espécie ou gênero-específicos mas não estágio específicos. Este fato torna o nosso antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 extremamente interessante pois se demonstrou, também, a sua estágio-especificidade, só sendo detectado nos antígenos ovulares do S. haematobium. Já foi relatado que as porções menos conservadas da seqüência de aminoácidos das proteínas "heat shock" são aquelas localizadas nas imediações da terminação carboxílica da molécula. Se analisarmos a seqüência parcial de aminoácidos da proteína do estresse que foi caracterizada neste trabalho, comparando com a seqüência de aminoácidos de proteínas do estresse do homem e do S. mansoni, em ambos os peptídeos trípticos, vamos verificar que a nossa seqüência esta localizada, caracteristicamente perto da terminação N-terminal da proteína e que pode representar um segmento bastante particular da nossa proteína.

Como e mostrado nas figuras 1 e 2, os imuno-"Western blots" resultaram em dois padrões distintos de imunorreatividade. O primeiro padrão é exemplificado pelo anticorpo

monoclonal 2D14E8, que reconheceu duas bandas antigênicas bem definidas, com mobilidades relativas (Mrs) aproximadas de 66 e 64 kDa, sob condições redutoras e não redutoras. O outro, um padrão difuso, foi encontrado com os anticorpos monoclonais 2B35C11, 3E25F7 e 3E64B9, que reconheceram um grupo de bandas antigênicas pouco definidas com Mrs de 40, 43, 64, 66, 97, 116 e 200 kDa, sob condições redutoras e não redutoras (Figura 1). O padrão de bandas difuso dos epitopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais 3E25F7 e 3E264B9 não são comparáveis a nenhum outro dado relatado na literatura. Somente a banda antigênica difusa com aproximadamente 40 kDa e denominada MEGL-H por Hamburger e cols. (1982) apresenta uma discreta similaridade. Os epitopos das várias bandas antigênicas reconhecidas pelos anticorpos monoclonais 3E25F7 e 3E264B9 foram sensíveis ao tratamento com baixas concentrações de metaperiodato de sódio. Esta particularidade química é frequentemente utilizada para sugerir a presença de epitopos com carboidratos. A discreta oxidação que ocorre com o periodato de sódio, em pH ácido, quebra grupos hidroxílicos na vizinhança de carboidratos (açúcares) sem alterar a estrutura da cadeia de polipeptídeos (Woodward e cols., 1985). Sugeriu-se que o antígeno denominado MEGL-H por Hamburger poderia ser um carboidrato em sua natureza química. Os epitopos reconhecidos pelo monoclonal 2D14E8 foram claramente insensíveis ao tratamento com o metaperiodato de sódio, mesmo em altas concentrações como 40 mM, aspecto esse compatível com a sua natureza proteica.

Ainda em relação à sensibilidade ao metaperiodato de sódio observou-se que todos os anticorpos monoclonais que reconhecem estes epitopos com carboidrato possuíam cadeias leves do tipo lambda (Tabela II). Em contraste, nenhum dos clones de anticorpos reconhecendo as bandas de 64 e 66 kDa tinham cadeia leve do tipo lambda. Todos esses anticorpos foram do isotipo IgG1 (Tabela II). Temos ainda que levar em consideração que a natureza química dos epitopos (carboidratos) reconhecidos pelos monoclonais podem estar relacionados ao isotipo de imunoglobulina produzido e em nosso caso, todos os monoclonais produzidos eram IgG1. Se os resultados aqui

apresentados são de natureza espúria ou refletem um processo de seleção devido a natureza do antígeno e assunto que permanece aberto a investigação.

É interessante ainda comentar que a análise do "imunoblot" bidimensional utilizando o anticorpo monoclonal 2D14E8 revelou que as bandas antigênicas com pesos moleculares de 64 e 66 kDa eram constituídas por vários isomorfos e em pHs diferentes. Um grupo de aproximadamente oito isomorfos tinha pontos isoelétricos com pH variando de 4,8 a 6,1. Um segundo grupo de aproximadamente 11 isomorfos tinha pontos isoelétricos com pH variando de 6,7 a 7,5 (Figura 3). Isto mostra que vários epitopos podem ser encontrados dentro da faixa antigênica reconhecida pelo anticorpo monoclonal 2D14E8 e é possível que tais epitopos tenham diferentes funções em imunodiagnóstico e imunoproliferação. Esta técnica de "imunoblot" bidimensional revela-se bastante útil no fracionamento, purificação e caracterização de epitopos presentes em misturas antigênicas complexas, podendo-se inclusive obter-se o sequenciamento de aminoácidos de determinada banda antigênica transferida para membrana de nitrocelulose ou outra matriz, como foi feito neste trabalho.

Como foi evidenciado, parte da seqüência de aminoácidos reconhecida pelo nosso anticorpo monoclonal 2D14E8 têm grande homologia com proteínas de estresse de peso molecular 70 de várias espécies animais. Tais proteínas vem sendo cada vez mais estudadas em imunologia e imunopatologia, motivo pelo qual faremos uma breve revisão sobre o assunto.

A exposição a elevada temperatura provoca uma seqüência similar de eventos em todos os organismos vivos, consistindo na inibição da síntese de proteínas de uso geral, aumento da produção de um conjunto limitado de certas proteínas, parada na proliferação e, finalmente, morte celular. Este fenômeno é conhecido como resposta "heat shock" ou resposta ao estresse, e as proteínas, cuja síntese é estimulada são as proteínas "heat shock" ou proteínas do estresse (Lindquist, 1988). Tais proteínas cujo peso molecular varia de 10 a 110 kDa, parecem desempenhar funções que permitem que células sobrevivam em temperaturas elevadas. A síntese de proteínas de estresse, é considerada por alguns como representando um mecanismo primitivo, não imunológico para a

discriminação entre antígenos próprios e os não próprios, é também, estimulada por infecções virais, interleucina 2, radicais livres derivados de oxigênio gerados como uma primeira linha de defesa contra parasitas e pela presença de proteínas denaturadas (Newport e cols., 1988; Ferris e cols., 1988; Polla e cols., 1993).

Parasitas que mudam de um ambiente poiquilotérmico para um hospedeiro de sangue quente aumentam a síntese de proteínas "heat shock" homólogas as do hospedeiro. A regulação da síntese de tais proteínas parece ocorrer a nível de transcrição e, em alguns casos, este fenômeno mostra distúrbios no comportamento dos eucariotas. Uma vez que as proteínas de estresse de alguns parasitas são componentes celulares importantes, a sua presença ocorre em ambientes vigiados pelo sistema imune. Isto leva a dois interessantes extremos: primeiro, a produção de imunoglobulinas específicas do parasita que são tão discriminativas que ocasionalmente podem ser utilizadas como meio diagnóstico da espécie do organismo invasor; segundo, o potencial para doença autoimune ou respostas-imune deletérias. Neste particular, Cohen and Young (1991) sugeriram que deve haver dois tipos de resposta imune contra proteínas de estresse: um deles relacionado com epitopos estranhos induzindo uma resposta agressiva convencional contra infecções e, o outro, quando epitopos conservados são reconhecidos por uma população de linfócitos T autorreativos e que são rigorosamente controlados. Assumindo que esse sistema funciona bem na maioria dos casos, seria previsível que a resposta imune contra proteínas de estresse de agentes patógenos fossem dominada pelo reconhecimento dos determinantes não conservados, e isto parece acontecer na maioria das situações. Todavia é possível que a regulação normal que ocorre seja alterada em algumas infecções e algumas proteínas de estresse possam iniciar uma reação do tipo autoimune o que pode causar problemas imunopatológicos como ocorre nas artrites, doença de Lyme e lepra tuberculóide (Lydyard e van Eden, 1990; Young, 1992).

Dados da literatura sugerem que o estímulo para a indução de proteínas de estresse em parasitas não é necessariamente uma alteração brusca na temperatura mas sim uma mudança na osmolaridade ou a presença de algum fator não identificado em

decorrência de uma alteração no ambiente (Polla e cols., 1993). Por exemplo, esta resposta pode ser provocada em promastigotas de leishmania mantidos em temperatura ambiente e que são colocadas em meios de cultura com características próximas aquelas oferecidas pelo hospedeiro mamífero (van Der Ploegh e cols., 1985).

Recentemente, Neumann e cols. (1993) estudaram a regulação da expressão do gene da proteína do estresse 70 em vários estágios evolutivos do S. mansoni (miracidio, esporocisto, cercária, esquistossomulo e verme adulto). Eles verificaram através da análise de RNA dos diferentes estágios evolutivos do parasita, que a expressão estágio específica da proteína do estresse 70 é regulada por dois mecanismos: estresse que é específico para a proteína "heat shock" 70 e um programa constitutivo relacionado com o desenvolvimento e que é compartilhado por outros genes não relacionados com a proteína "heat shock" 70.

Estudos sobre a resposta imune de seres humanos contra o S. mansoni indicam que, embora a resposta seja errática, quase todos os indivíduos reagem contra duas proteínas esquistossomóticas, uma com 70 kDa e a outra com 38 kDa (Newport e cols., 1988; Hedstrom e cols., 1987; Moser e cols., 1990). Anticorpos contra essas duas proteínas esquistossomóticas não são detectados em pessoas sadias ou em pessoas infectadas com outros helmintos indicando que elas podem encerrar algum potencial diagnóstico. A proteína esquistossomótica de 70 kDa foi identificada como homóloga da proteína "heat shock" 70. O mapeamento de epitopos desta proteína têm revelado que as porções imunogênicas da molécula estão localizadas perto da terminação carboxílica da proteína, o domínio menos conservado das proteínas do estresse em geral. Contudo, curiosamente, os imunógenos esquistossomóticos com 70 kDa não dão reação cruzada entre si, principalmente entre o S. mansoni e o S. japonicum (Hedstrom e cols., 1988).

Finalmente, neste trabalho, foi possível identificar um antígeno espécie específico do S. haematobium através da produção de hibridomas utilizando-se camundongos imunizados com antígenos ovulares do S. haematobium. A caracterização imunoquímica parcial deste antígeno mostrou ser o mesmo uma proteína, cuja seqüência parcial de aminoácidos apresenta uma grande homologia com proteínas do estresse de 70 kDa de

várias espécies animais, incluindo o homem e o S. mansoni. Curiosamente, esta proteína homóloga à proteína de estresse 70 foi estágio específica, sendo apenas detectada nos antígenos ovulares esquistossomóticos.

Além desses dados imediatos, seria bastante interessante verificar o potencial deste antígeno em imunodiagnóstico diferencial entre esquistossomose mansônica e hematúria, pesquisar o seu possível uso em imunoprofilaxia e verificar o seu possível papel nas reações granulomatogênicas periovulares, cabendo ainda a complementação da sua seqüência de aminoácidos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R.H.; LEAVITT, J.; SAAVEDRA, R.A.; HOOD, L.E. - Internal amino acid sequence analysis of proteínas separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, USA, 84:6970-6974, 1987.
- ANDRADE, Z.A. & SADIGURSKY, M. - Immunofluorescence studies of schistosome structures which share determinants with circulating schistosome antigens. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72:316-318, 1978.
- BARSOUM, I.S.; COLLEY, D.G.; KAMAL, K.A. - Schistosoma mansoni: Detection of circulating antigens in murine Schistosomiasis by antigen-capture sandwich ELISA using a monoclonal antibody. Exp. Parasitol., 71:107-113, 1990.
- BOCTOR, F.N.; NASH, T.E.; CHEEVER, A.W. - Isolation of polysaccharide antigen from Schistosoma mansoni eggs. J. Immunol., 122:39-43, 1979.
- BOUT, D. & CARLIER, Y. - Helminth functional antigens (with special reference to S. mansoni). Pathol. Biol., 30:176-187, 1982.
- BRADFORD, M.M. - A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 72:248-254, 1976.
- BROWN, A.P.; REMOLD, H.G.; WARREN, K.S.; DAVID, J.R. - Partial purification of antigens from eggs of Schistosoma mansoni that elicit delayed hypersensitivity. J. Immunol., 119:1275-1278, 1977.

- CARTER, C.E. & COLLEY, D.G. - Partial purification and characterization of Schistosoma mansoni soluble egg antigen with Con A-sepharose chromatography. J. Immunol., 122:2204-2209, 1979.
- CARTER, C.E.; FU, C.; COLLEY, D.G. - The effect of praziquantel on the circulating antigen Sj 70 in murine schistosomiasis japonica. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 42:342-346, 1990.
- COHEN, C.B.E. - Monoclonal antibodies in parasitic infectious diseases. Brit. Med. Bull., 40:291-297, 1984.
- COHEN, I.R. & YOUNG, D.B. - Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol. Today, 12:105-110, 1991.
- COONS, A.H. & KAPLAN, M.H. - Localization of antigen in tissues cells. II. Improvements in a method for detection of antigens by means of fluorescent antibody. J. exp. Med., 91:1-5, 1950.
- COKER, C.M. & von LICHTENBERG, F. - A revised method for isolation of Schistosoma mansoni eggs for biological experimentation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92:780-, 1956.
- CRUISE, K.M.; MITCHELL, G.F.; GARCIA, E.G.; TIU, W.U.; HOCKING, R.E.; ANDERS, R.F. - Sj 23, the target antigen in Schistosoma japonicum adult worms of an immunodiagnostic hybridoma antibody. Paras. Immunol., 5:37-46, 1983.
- DEELDER, A.M. & EVELEIGH, P.C. - An indirect haemagglutination reaction for the demonstration of Schistosoma mansoni circulating anodic antigen. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 72:178-180, 1978.

- DEELDER, A.M.; KORNELIS, D.; MAKBIN, M.; NOORDPOOL, H.N.; CODFRIED, R.M.; ROTMANS, J.P.; OOSTBURG. - Applicability of different antigen preparations in the enzyme-linked immunosorbent assay for schistosomiasis mansoni. Amer. J. trop. Med. Hyg., 29:401-410, 1980.
- DEELDER, A.M.; JONGE, N.; FILLE, Y.E., KORNELIS, K.; HELAHA, D.; QIAN, Z.L.; CALUWE, P.; PORDERMAN, A.M. - Quantitative determination of circulating antigens in human schistosomiasis mansoni using an indirect hemagglutination assay. Amer. J. trop. Med., 40:50-54, 1989.
- DEELDER, A.M. & PLOEM, J.S. - An immunofluorescence reaction for *Schistosoma mansoni* using the defined antigen substrate spheres (DASS) system. J. Immunol. Meth., 4:239-251, 1974.
- DEELDER, A.M.; RUITENBERG, E.J.; KORNELIS, D.; STEERENBERG, P.A. - *Schistosoma mansoni*: Comparison of the immunoperoxidase techniques, DASS and ELISA, for human diagnosis. Exp. Parasitol., 41:133-140, 1977.
- DIAS, L.C.S.; KANAMURA, H.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; GLASSER, C.M.; CARVALHO, J.F.; DA SILVA, L.C. - Field trials for immunodiagnosis with reference to *Schistosoma mansoni*. In BERQUIST, R., ED. Immunodiagnostic Approaches in Schistosomiasis. Proceedings of ICGEB/TDR Symposium, Shanghai, WHO, 1990.
- DUNNE, D.W.; LUCAS, S.; BICKLE, Q.; PEARSON, S.; MADGWICK, L.; BAIN, J.; DOENHOFF, M.J. - Identification and partial purification of an antigen (W1) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. Trans.Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 75:54-71, 1981.

- DUVALL, R.H.& DeWITT, W.B. - An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. Amer. J. trop. Med. Hyg., 16:483-486, 1967.
- EDWARDS, E.A. - Immunologic investigations of meningococcal disease. I. Group-specific Neisseria meningitidis antigens present in the serum of patients with fulminating meningococcemia. J. Immunol., 106:314-317, 1971.
- EL ALAMY, M.A.& CLINE, B.L. - Prevalence and intensity of Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni infection in Qalyub, Egypt. Amer. J. trop. Med. Hyg., 26:470-472, 1977.
- ENGVALL, E.& PERLMANN, P. - Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Immunol., 109:129-135, 1972.
- FARAG, H.F.; BARAKAT, R.M.R.; AWADALLA, H.N.; EL-GOHARY, Y. - Diagnosis of Bilharziasis (S. haematobium and S. mansoni) by ELISA using the homologous antigen. Trop. Parasitology, 29:413- 416, 1978.
- FERRIS, D.K.; HAREL-BELLAN, A.; MORIMOTO, R.I.; WELCH, W.J. - Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:3850-3854, 1988.
- FU, C.& CARTER, C.E. - Detection of a circulating antigen in human schistosomiasis japonica using a monoclonal antibody. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 42:347-351, 1990.
- GALEN, R.S.& GAMBINO, S.R. Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnosis. J. Wiley & Sons., New York, 1975. APUD. GUIMARÃES, M.C.S., 1985.

- GUIMARÃES, M.C.S. - Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. Rev. Soc. bras. Med. trop., 18:117-120, 1985.
- GRABAR, P.& WILLIAMS, C.A. - Methode immuno-electrophoretique d'analyse de melanges de substances antigeniques. Biochim. Biophys. Acta, 10:193-194, 1953.
- HAMBURGUER, J.; LUSTIGMAN, S.; SIONGOK, T.K.A.; OUMA, J.H.; MAHMOUD, A.A.F. - Analysis and preliminary purification of glycoproteins isolated from eggs in the urine of patients with Schistosoma haematobium infection. J. Immunol., 4:1711-1714, 1982.
- HAMBURGER, J.; PELLE, R.P.; WARREN, K.S. - Schistosoma mansoni soluble egg antigens: determination of the stage and species specificity of their serologic reactivity by radioimmunoassay. J. Immunol., 117:1561-1566, 1976.
- HARN, D.A.; MITSUYAMA, M.; DAVID, J.R. - Schistosoma mansoni: Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. J. exp. Med., 154:1371-1387, 1984.
- HARRISON, D.J.; CARTER, C.E.; COLLEY, D.G. - Immunoaffinity purification of Schistosoma mansoni soluble egg antigens. J. Immunol., 122:2210-2217, 1979.
- HEDSTROM, R.; CULPEPPER, J.; HARRISON, R.A.; AGABIAN, N.; NEWPORT, G. - A major immunogen in Schistosoma mansoni infections is homologous to the heat-shock protein HSP 70. J. exp. Med., 165:1430-1435, 1987.
- HEDSTROM, R.; CULPEPPER, J.; SCHINSKY, V.; AGABIAN, N.; NEWPORT, G. - Schistosome heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. Mol. Biochem. Parasitol., 29:275- 282, 1988.

- HIATT, R.A.; CLINE, B.L.; KNIGHT, W.B. - Limitations of the intradermal test for schistosomiasis mansoni: experience from epidemiologic studies in a Puerto Rican community. Amer. J. trop. Med. Hyg., 27:535-541, 1978.
- HILLYER, G.V. & GOMES de RIOS, I. - The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of Schistosomiasis. Amer. J. trop. Med. Hyg., 28:237-241, 1979.
- HILLYER, G.V. & PACHECO, E. - Isolation and characterization of Schistosoma haematobium egg antigens. Amer. J. trop. Med. Hyg., 35:777-785, 1986.
- HILLYER, G.V. & PELLELY, R. - The major serological antigen (MSA1) from Schistosoma mansoni eggs is a "circumoval" precipitogen. Amer. J. trop. Med. Hyg., 29:582-585, 1980.
- HILLYER, G.V.; RAMZY, R.M.R.; EL-ALAMY, M.A.; CLINE, B.L. - Immunodiagnosis of infection with Schistosoma haematobia and Schistosoma mansoni in man. Amer. J. trop. Med. Hyg., 29:1254 -1257, 1980.
- HILLYER, G.V.; RAMZY, R.M.R.; EL-ALAMY, M.A.; CLINE, B.L. - The circumoval precipitin test for the serodiagnosis of human schistosomiasis mansoni and haematobia. Amer. J. trop. Med. Hyg., 30:121-126, 1981.
- HILLYER, G.V.; TIBEN, E.R.; KNIGHT, W.B.; RIOS, I.G.; PELLELY, R.P. - Immunodiagnosis of infection with Schistosoma mansoni: comparison of ELISA, Radioimmunoassay, and precipitation tests performed with antigens from eggs. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 28:661-669, 1979.

JONGE, N.; FILLIE, Y.E.; HILBERATH, W.; KRIJGER, F.W.; LENGELER, C.; SAVIGNY, D.H.; VLIET, N.G., DEELDER, A.M. - Presence of the schistosome circulating anodic antigen (CAA) in urine of patients with Schistosoma mansoni or S. haematobium infections. Amer. J. trop. Med. Hyg., 41:563-569, 1989.

KAGAN, I.G. - Contributions to the immunology and serology of schistosomiasis. Rice Institute Pamphlet, 45:151-183, 1958.

KAGAN, I.G. - Diagnostic, epidemiologic, and experimental parasitology: immunologic aspects. Amer. J. trop. Med. Hyg., 28:429-439, 1979.

KAGAN, I.G.; KAISER, R.L.; KENT, N. - Comparison of Schistosoma mansoni, S. japonicum, and Trichinella spiralis antigens in skin tests on persons with schistosomiasis mansoni and haematobium. Amer. J. trop. Med. Hyg., 15:719-724, 1966.

KAGAN, I.G. & PELLEGRINO, J. - Critical review of immunological methods for diagnosis of bilharziasis. Bull. Wrld. Health Org., 25:611-674, 1961a.

KAGAN, I.G.; PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J.M.P. - Studies on the standardization of the intradermal test for the diagnosis of bilharziasis. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 10:200-207, 1961b.

KANAMURA, H.Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M.E.; DA SILVA, L.C. - Class specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of schistosomiasis mansoni. Amer. J. trop. Med. Hyg., 28:242-248, 1979.

- KATZ, N.; CHAVES, A.; PELEGRINO, J. - A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 14:397-400, 1972.
- KENETT, R.H.; DENIS, K.A.; TUNG, A.S.; KLNEMAIR, N.R. - Hybrid plasmacytoma production: fusions with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells. Cur. topics Microbiol. Immunol., 8:77-91, 1978.
- KOHLER, G. & MILSTEIN, C. - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256:495- 497, 1975.
- LAEMMLI, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685, 1970.
- LAMBERTUCCI, J.R.; MELLO, R.T.; PEDROSO, E.R.P.; GRECO, D.B.; ROCHA, M.O.C. - The circumoval precipitin test as a control of cure in children with chronic schistosomiasis mansoni. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 25:37-41, 1983.
- LAZDINS, J.K.; STEIN, J.J.; DAVID, J.R.; SHER, A. - Schistosoma mansoni: rapid isolation and purification of schistosomula of different developmental stages by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. Exp. Parasitol., 53:39-44, 1982.
- LINDQUIST, S. - The heat-shock proteins. Annu. Rev. Genetics, 22:631-677, 1988.
- LYDYARD, P.M.; van EDEN, W. - Heat shock proteins: immunity and immunopathology. Immunology Today, 11:228-229, 1990.

- McLAREN, M.; DRAPER, C.C.; ROBERTS, J.M.; MINTER-GOEEDBLOED, E.; LIGTHART, G.S.; TEESDALE, C.H.; AMIN, MA.A.; OMER, A.H.S. - Studies on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for Schistosoma mansoni infections. Ann. trop. Med. Parasitol., 72:243-253, 1978.
- MELLO, R.T.; PEREIRA, L.H.; KATZ, N.; PELLEGRINO, J. - Circumoval precipitin test in the pre-patent and acute phases of human schistosomiasis mansoni infection. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 72:553-554, 1978.
- MITCHELL, G.F. - Hybridoma antibodies in immunodiagnosis of parasitic infection. Parasitol. Today, 2:140-142, 1981.
- MITCHELL, G.F.; GARCIA, E.G.; CRUISE, K.M. - Competitive radioimmunoassay using hybridoma and anti-idiotypic antibodies in identification of antibody responses to, and antigens of, Schistosoma japonicum. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci., 61:27-36, 1983.
- MORIEARTY, P.L. & LEWERT, R.M. - Delayed hypersensitivity in Ugandan schistosomiasis. I. Sensitivity, specificity, and immunological features of intradermal responses. Amer. J. trop. Med. Hyg., 23:169-178, 1974a.
- MORIEARTY, P.L. & LEWERT, R.M. - Delayed hypersensitivity in Ugandan schistosomiasis. II. Epidemiologic patterns of intradermal responses. Amer. J. trop. Med. Hyg., 23:179-189, 1974b.
- MOSER, D.; DOUMBO, O.; KLINKERT, M.Q. - The humoral response to heat shock protein 70 in human and murine Schistosomiasis mansoni. Par. Immunol., 12:341-352, 1990.

- NASH, T.E. - Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and Specificity. Amer. J. trop. Med. Hyg., 27:938-943, 1978.
- NASH, T.E. & DEELDER, A.M. - Comparison of four schistosome excretory-secretory antigens: phenol sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, gut-associated proteoglycan, and circulating anodic antigen. Amer. J. trop. Med. Hyg., 34:236 -241, 1985.
- NASH, T.E.; GARCIA-COYCO, C.; RUIZ-TIBEN, E.; NAZARIO-LOPEZ, H.A.; VAZQUEZ, G.; TORRES-BORGES, A. - Differentiation of acute and chronic schistosomiasis by antibody responses to specific schistosomes antigens. Amer. J. trop. Med., 32:776-784, 1983.
- NASH, T.E.; LUNDE, M.N.; CHEEVER, A.W. - Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult Schistosoma mansoni. J. Immunol., 126:805-810, 1981.
- NASH, T.E.; PRESCOTT, B.; NEVA, F.A. - The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. J. Immunol., 112:1500 -1507, 1974.
- NEUMANN, E.Z.; LANTNER, F.; SCHECHTER, I. - Regulation of HSP 70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth Schistosoma mansoni. Europ. J. Biochem., 212:589-596, 1993.
- NEWPORT, G.; CULPEPPER, J.; AGABIAN, N. - Parasite heat-shock proteins. Parasitol. Today, 4:306-312, 1988.

- NORDEN, A.P. & STRAND, M. - Schistosoma mansonii, Schistosoma haematobium and Schistosoma japonicum: Identification of genus -, species-, and gender-specific antigenic worm glycoproteins. Exp. Parasitol., 57:110-123, 1984.
- NORDEN, A.P. & STRAND, M. - Identification of antigenic Schistosoma mansonii glycoproteins during the course of infection in mice and humans. Amer. J. trop. Med. Hyg., 34:495- 507, 1985.
- OLIVIER-GONZALEZ, J. - Anti-egg precipitins in the serum of humans infected with Schistosoma mansonii. J. Infect. Dis., 95:86-91, 1954.
- O'FARREALL, P. - High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 350:4007-4021, 1975.
- OUCHTERLONY, O. - In vitro method for testing the toxin-producing capacity of diphtheria bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 25:186-191, 1947.
- LOUDIN, J. - L'analyse immunochimique du serum de cheval par precipitation specifique en milieu gelatiné. Premiers resultats. Bull. Soc. Chim. Biol., 29:140-149, 1947.
- POLLA, B.S.; PERIN, M.; PIZURKI, L. - Regulation and functions of stress proteins in allergy and inflammation. Clin. Exp. Allergy, 23:548-556, 1993.
- PELLEGRINO, J. - The intradermal test in the diagnosis of bilharziasis. Bull. Wrld Hlth Org., 18:945-961, 1958.
- PELLEGRINO, J.; MEMORIA, J.M.P. - A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. I. Ensaio comparativo com antígenos de cercárias, vermes adultos, ovo e miracídio. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 2:171-176, 1960a.

- PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J.M.P. - A reação intradérmica na esquistossomose mansoni. V. Resposta cutânea do tipo tardio. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 2:265-267, 1960b.
- PELLEY, R.P.; PELLY, R.J.; HAMBURGER, J.; PETERS, P.A.; WARREN, K.S. - Schistosoma mansoni soluble egg antigens. I. Identification and purification of three major antigens, and the employment of radioimmunoassay for their further characterization. J. Immunol., 117:1553-1560, 1976.
- PELLEY, R.P.; WARREN, K.S.; JORDAN, P. - Purified antigen radioimmunoassay in serological diagnosis of Schistosomiasis mansoni. Lancet, 15:781-785, 1977.
- RUIZ-TIBEN, E.; HILLYER, G.V.; KNIGHT, W.B.; GOMES de RIOS, I.; WOODALL, J.P. - Intensity of infection with Schistosoma mansoni: its relationship to the sensitivity and specificity of serologic tests. Amer. J. trop. Med. Hyg., 28:230-236, 1979.
- RUPPEL, A.; DIESFELD, H.J.; ROTHER, U. - Immunoblot analysis of Schistosoma mansoni antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. Clin. exp. Immunol., 62:499-506, 1985.
- SADUN, E.H.; WILLIAMS, J.S.; ANDERSON, R.I. - Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of schistosomiasis in humans. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 105:289-291, 1960.
- SANTORO, F.; PRATA, A.; CASTRO, C.N.; CAPRON, A. - Circulating antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis: relationship with Schistosoma mansoni egg output. Clin. exp. Immunol., 42:219-225, 1980

- SANTORO, F.; CARLIER, Y.; BOROJEVIC, R.; BOUT, D.; TACHON, P.; CAPRON, A. - Parasite "M" antigen in milk from mothers infected with Schistosoma mansoni. (Preliminary report). Ann. trop. Med. Parasitol., 71:121-123, 1977.
- TRACY, J.W.; DOMINGO, E.O.; MAHMOUD, A.A.F. - Evaluation of a purified Schistosoma japonicum glycoprotein egg antigen for the immunodiagnosis of infection in man. Amer. J. trop. Med. Hyg., 34:92-95, 1985.
- TIU, W.U.; DAVERN, K.M.; GARCIA, E.G.; MOLL, H.; MITCHELL, G.F. - Monoclonal antibodies reacting with Schistosoma japonicum eggs and their target epitopes. Acta Trop., 46:75-92, 1989.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Proc. Nat.l Acad. Sci., USA, 76:4350-4354, 1982.
- VAN der PLOEG, L.H.T.; GIANNINI, S.H.; CANTOR, C.R. Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa - Science, 228:1443-1446, 1985.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. - Enzyme immuno assays for parasitic diseases, in Symposium on recent advances in the serology of tropical diseases. Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg., 70:98-106, 1976.
- WILSON, M.; SULZER, A.J.; WALLS, K.W. - Modified antigens in the indirect immunofluorescence test for schistosomiasis. Amer. J. trop. Med. Hyg., 23:1072-1076, 1974.

WOODWARD, M.P.; YOUNG Jr, W.W.; BLOODGOOD, R.A. - Detection of monoclonal antibodies specific for carbohydrate epitopes using periodate oxidation. J. Immunol. Meth., 89:143-153, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES - Report of a meeting on application of immunodiagnosis in schistosomiasis, 15-16 January, New York, USA, 1992.

WRAY, W.; BOULIKAS, T.; WRAY, V.P.; HANCOCK, R. - Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 118:197-203, 1981.

YOGORE, M.G.; LEWERT, R.M.; SILAN, R. - The circumoval precipitin (COP) test in schistosomiasis japonica. Amer. J. trop. Med. Hyg., 17:65-71, 1968.

YOUNG, D.B. - Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity. Curr. Opin. Immunol., 4:396-400, 1992.

