

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Caracterização de Duas Diferentes Subunidades do Antígeno B de
Echinococcus granulosus e Avaliação Sorológica de Antígenos
Recombinantes**

Marilise Brittes Rott

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica da UFRGS como
um dos requisitos para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre

2000

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e no Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) – Subprograma de Biotecnologia (SBIO-CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Ao meu marido João Antonio
e aos meus filhos Felipe e Eduardo

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar sempre a certeza de que vou atingir meus objetivos.

Ao Dr. Arnaldo Zaha, pela sua orientação, amizade, dedicação, compreensão e manutenção de objetivos quando surgiam dificuldades.

Aos Drs. Karen Haag, Henrique Ferreira e Sandra Farias, pelos auxílios e ensinamentos prestados durante a execução do trabalho.

Aos colegas de bancada, pela amizade e companheirismo que tomaram sempre mais alegres e amenos os dias passados no laboratório, mesmo quando apareciam as dificuldades. Em especial agradeço à Marlise, Gustavo, Claudinha, Elizabeth, Etel, Monica, Melissa e Cristiano.

À bolsista de iniciação Janine por sua dedicação, companheirismo e amizade.

Aos amigos de outros laboratórios que sempre foram tão companheiros.

Aos chefes de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia que sempre estiveram prontos a ensinar e colaborar na realização deste trabalho, apresentando muitas vezes críticas e sugestões construtivas.

A todos os funcionários do Centro de Biotecnologia, que de uma forma ou de outra foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do LACEN que me acolheram com tanto carinho e foram fundamentais à execução deste trabalho. Em especial à Fátima, Sílvia, Cloé, Jader, Marila, Tatiana, Márcia, José Paulo e Nádia.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Microbiologia, sempre tão compreensivos e dispostos a colaborar.

Aos meus pais, familiares e amigos que sempre me incentivaram na conquista dos meus objetivos.

Ao meu marido, amor e companheiro por sempre me dar incentivo e força compartilhando comigo todos os momentos alegres ou não muito felizes durante a execução do trabalho.

Aos meus filhos Eduardo e Felipe, as mais novas razões de minha vida, pela “companhia” durante a execução do trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	8
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. O parasito e a doença.....	15
1.2. Antígenos parasitários.....	30
1.2.1. Antígenos recombinantes.....	34
1.2.2. Peptídeos sintéticos	41
1.3. Diagnóstico imunológico da hidatidose humana	43
1.4. Objetivos	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1. Linhagens bacterianas, vetores, enzimas, antibióticos, meios de cultura e soluções utilizadas	47
2.2. Cistos hidáticos	47
2.3. Preparações antigênicas de líquido hidático	48
2.4. Dosagem de proteínas	48
2.5. Soros de pacientes	49
2.6. Preparação do lisado de <i>E. coli</i>	50
2.7. Purificação de ácidos nucleicos	50
2.7.1. Purificação de DNA plasmidial	50
2.7.2. Purificação de fragmentos de DNA	50
2.7.3. Purificação de RNA de protoescólices	51
2.8. RT-PCR.....	52
2.9. Extração de DNA de protoescólices.....	53
2.10. Clonagens.....	53
2.11. Eletro-transformação bacteriana	54
2.12. Oligonucleotídeos utilizados.....	55
2.13. Marcação de sondas de DNA e hibridização	56
2.14. Condições de amplificação das seqüências de AgB8/1 por PCR	56
2.15. Seqüenciamento de DNA.....	57
2.16. Determinação das seqüências genômicas (AgB8/1 e AgB8/2) do antígeno B.....	57
2.17. Purificação de antígenos recombinantes expressados em <i>E. coli</i>	58
2.18. "Western blot" (transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose e ensaio imunoenzimático)	59
2.19. ELISA	60
2.20. Produção de anticorpos monoclonais contra a proteína recombinante (AgB8/1)	61
2.21. Anticorpos monoclonais anti-GST e contra antígenos recombinantes	61
3. RESULTADOS.....	62

3.1. Clonagem e seqüenciamento do fragmento de cDNA do antígeno B/1 de <i>E. granulosus</i>	62
3.2. Clonagem e seqüenciamento do fragmento genômico do AgB8/1 de <i>E. granulosus</i>	65
3.3. Comparação das seqüências genômicas do AgB8/1 e do AgB8/2	65
3.4. Confirmação da antigenicidade da proteína de fusão AgB8/1-GST em imunoblot.....	68
3.5. Purificação da proteína de fusão AgB8/1-GST produzida em <i>E. coli</i>	70
3.6. Expressão das proteínas recombinantes AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8 completa (Ag8c) e Ag8 truncada (Ag8t)	72
3.7. Obtenção de anticorpo monoclonal contra a proteína recombinante AgB8/1	78
3.8. Caracterização das proteínas recombinantes AgB8/1 e AgB8/2.....	80
3.9. Padronização dos testes de ELISA usados para avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos recombinantes.....	83
3.10. Avaliação do potencial do antígeno recombinante AgB8/1 para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA.....	83
3.11. Análise comparativa dos resultados obtidos nos testes de ELISA para os diferentes antígenos recombinantes frente aos soros de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente	85
3.12. Análise comparativa dos resultados obtidos nos testes de ELISA para os diferentes antígenos recombinantes frente aos soros de pacientes com hidatidose sem confirmação cirúrgica	86
3.13. Resultados dos testes de ELISA com o peptídeo sintético GU4 para avaliação de seu potencial diagnóstico em comparação com o recombinante AgB8/2.....	86
4. DISCUSSÃO	93
5. CONCLUSÕES	102
6. PERSPECTIVAS.....	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
8. APÊNDICE.....	124
ANEXO: Comparative Analysis of Two Different Subunits of Antigen B from <i>Echinococcus granulosus</i>: Gene Sequences, Expression in <i>Escherichia coli</i> and Serological Evaluation. Marilise B. Rott, Verónica Fernández, Sandra Farias, Janine Ceni, Henrique B. Ferreira , Karen L. Haag and Arnaldo Zaha (trabalho publicado na revista Acta Tropica 75 (2000): 331-340)	
	127

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenina
[α^{32}]dATP	desoxiadenosina 5' [α^{32} P] trifosfato
A_{492}	absorbância medida a 492 nm
BSA	albumina de soro bovino
C	citossina
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
DAB	diaminobenzidina
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleosídeo trifosfato
DTT	ditiotretol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético; sal sódico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
G	guanina
g	coeficiente gravitacional
GST	glutathiona S-transferase
h	horas
IgG	imunoglobulinas da classe G
IPTG	1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton

M	Molar
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
N	normal
ng	nanograma
nm	nanômetros
nt	nucleotídeo
OPD	ortofenilenodiamina
pb	par(es) de base(es)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction-</i> transcrição reversa seguida de amplificação em cadeia pela polimerase
Seg	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
T	timina
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris(hidroxi-metil) aminometano
Triton X-100	éter octilfenólico do decaetilenoglicol
U	unidade (de atividade enzimática)

UV	radiação ultravioleta
V	volt
μg	micrograma
μl	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Adulto de <i>E. granulosus</i>	17
Figura 1.2: Ciclo vital de <i>Ecchinococcus granulosus</i>	18
Figura 1.3: Metacestóide de <i>E. granulosus</i>	19
Figura 3.1: Seqüência de cDNA e mapa físico do inserto de cDNA de AgB8/1	63
Figura 3.2: Análise eletroforética de extratos protéicos de células de <i>E. coli</i> DH5 α portadoras do plasmídeo pGEX-AgB8/1	64
Figura 3.3: Comparação entre seqüências de exons, íntrons e aminoácidos dos antígenos AgB8/1 e AgB8/2	67
Figura 3.4: Análise em western blot da proteína de fusão AgB8/1-GST	69
Figura 3.5: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante AgB8/1 por eletroforese em SDS-PAGE	71
Figura 3.6: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante AgB8/2 por eletroforese em SDS-PAGE	73
Figura 3.7: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag4 por eletroforese em SDS-PAGE	74
Figura 3.8: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag5 por eletroforese em SDS-PAGE	75
Figura 3.9: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag8c por eletroforese em SDS-PAGE	76
Figura 3.10: Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag8t por eletroforese em SDS-PAGE	77
Figura 3.11: Análise em <i>western blot</i> da reatividade do anticorpo monoclonal α -AgB8/1	79
Figura 3.12: Antigenicidade das proteínas recombinantes AgB8/1 e AgB8/2 ..	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Oligonucleotídeos utilizados e suas seqüências.....	55
Tabela 3.1: Resumo dos resultados obtidos em ELISA usando os antígenos recombinantes AgB8/1, AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8t, Ag8c e o peptídeo sintético GU4.....	88
Tabela 3.2: Resultados dos testes de ELISA com os antígenos recombinantes frente a soros de pacientes com hidatidose (confirmada cirurgicamente e/ou por outros testes imunológicos). Para comparação, são também apresentados os resultados dos mesmos soros nos outros testes imunodiagnósticos realizados	89
Tabela 3.3: Resumo da avaliação do potencial dos antígenos recombinantes testados para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA.....	91
Tabela 3.4. Resumo da avaliação do potencial dos antígenos recombinantes testados para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA mostrando valores médios de sensibilidade e especificidade	92

RESUMO

Duas diferentes subunidades (AgB8/1 e AgB8/2) do antígeno B de *Echinococcus granulosus* foram caracterizadas e a estrutura dos genes que codificam essas proteínas foram comparadas. As seqüências de DNA foram expressas em *Escherichia coli* e o valor diagnóstico dos antígenos foi determinado. A seqüência genômica do AgB8/1 apresenta um íntron de 92 pb na posição correspondente ao aminoácido 16 e a seqüência genômica do AgB8/2 apresenta um íntron de 68 pb na posição correspondente ao aminoácido 20. Ambos os íntrons estão localizados entre a porção N-terminal hidrofóbica e a proteína secretada.

O potencial diagnóstico dos antígenos recombinantes AgB8/1, AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8t e Ag8c foi testado em ELISA frente a uma soroteca de 211 soros.

O antígeno recombinante AgB8/2 mostrou uma sensibilidade média de 86,95% e uma especificidade de 96,72% em ELISA, apresentando portanto, uma melhor performance para diagnóstico da hidatidose cística do que os demais recombinantes testados no presente trabalho.

Entre os antígenos recombinantes testados o AgB8/1 e o AgB8/2 não apresentaram reações cruzadas com soros de pacientes com cisticercose e o recombinante AgB8/2 mostrou ser espécie-específico com o painel de soros utilizado.

Testes com o peptídeo sintético GU4 mostraram sua mais baixa performance diagnóstica em ELISA, quando comparada com o antígeno recombinante AgB8/2 cuja porção C-terminal ele mimetiza.

ABSTRACT

Two different *Echinococcus granulosus* antigen B subunits (AgB8/1 and AgB8/2) were characterized and the structure of the genes encoding these two proteins were compared. DNA sequences were expressed in *Escherichia coli* and the antigens diagnostic value was then assessed. The genomic sequences of AgB8/1 has a 92 bp intron in the position corresponding to amino acid 16; the AgB8/2 genomic sequence presents a 68 bp intron in the position corresponding to amino acid 20. Either introns is located between the putative N-terminal hydrophobic sequence and the secreted protein.

The diagnostic performance of the recombinants AgB8/1, AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8t and Ag8c was tested in ELISA with 211 sera.

The recombinant antigen AgB8/2 showed a sensitivity of 86,95% and a specificity of 96,72% in ELISA, showing the best diagnostic performance in ELISA among all recombinants tested in this work.

The two recombinant antigens (AgB8/1 and AgB8/2) did not show cross-reaction with cysticercosis patient sera and the recombinant AgB8/2 was species-specific.

The GU4 synthetic peptide showed lower diagnostic performance than the recombinant AgB8/2 which C-terminal portion it mimics.

1. INTRODUÇÃO

“Os últimos estudos nos mostram um panorama muito obscuro pois a equinococose ou doença hidática é sem dúvida uma zoonose emergente cuja importância vem aumentando. Esforços de controle parecem ter tido pouco impacto globalmente, com sucesso limitado a poucas áreas localizadas” (THOMPSON, 1995).

Uma característica da pesquisa/pesquisador é a necessidade de um estímulo que justifique sua existência. A colocação acima serviu como uma alavanca impulsionando a realização deste trabalho com o propósito de deixar uma contribuição no avanço do estudo desta importante zoonose.

1.1. O parasito e a doença

Echinococcus Rudolphi, 1801 é um pequeno verme chato, endoparasito pertencente à classe Cestoda. Ele não tem sistema digestivo e todo o intercâmbio metabólico tem lugar através da cobertura sincicial externa, o tegumento. Na porção anterior, o adulto possui um especializado órgão de fixação (escólex) dotado de duas fileiras de acúleos e quatro ventosas musculares. O corpo, ou estróbilo, é segmentado e consiste de 3 a 5 unidades reprodutivas (proglótides) (Fig.1.1). Possui um ciclo de vida indireto, no qual o adulto é hermafrodita e a larva, o cisto hidático ou hidátide, prolifera assexuadamente.

Echinococcus exhibe certas características únicas que o coloca à parte de outros importantes gêneros na família Taeniidae. Um adulto de *Echinococcus* possui somente poucos milímetros (2 a 11 mm) de comprimento, raramente possui mais

que 5 proglótides, enquanto espécies de *Taenia* podem crescer muitos metros em comprimento e consistem de muitos milhares de proglótides. Ao contrário da *Taenia*, o estágio larval do *Echinococcus* exibe um baixo grau de especificidade ao hospedeiro e tem um maior potencial reprodutivo. *Echinococcus* requer dois hospedeiros mamíferos para completar seu ciclo de vida: um hospedeiro definitivo (final), no qual o adulto (estágio estrobilar) se desenvolve no intestino delgado e um hospedeiro intermediário no qual o metacestóide cístico se desenvolve nas vísceras (Fig. 1.2). O hospedeiro definitivo é sempre um carnívoro. Ele se infecta por ingestão de protoescólices, os quais são produzidos por multiplicação assexual do metacestóide. Há talvez, muitos milhares de protoescólices dentro de um simples cisto e cada um é capaz de desenvolver-se em um verme adulto sexualmente maduro. Vermes adultos produzem ovos, cada um contendo um simples embrião (oncosfera), os quais são liberados nas fezes do hospedeiro definitivo. Os ovos, os quais são capazes de sobreviver no meio ambiente por períodos variados, são infectivos a numerosas espécies de hospedeiros intermediários herbívoros e omnívoros, após ingestão.

A infecção com *Echinococcus* pode ser naturalmente transmitida entre humanos e outros animais. Isto, portanto, o torna membro do mais significativo grupo de doenças comunicáveis, as zoonoses. A significância clínica e econômica do parasito é quase completamente confinada à infecção com o metacestóide. Doença hidática, hidatidose e equinococose são todos termos usados para se referir à infecção com o metacestóide. Estritamente falando, os termos doença hidática e hidatidose deveriam ser restritos à infecção com o metacestóide e equinococose à infecção com o estágio adulto. Entretanto, recentes monografias tratando do controle de infecções por *Echinococcus* usam os três termos indiscriminadamente.

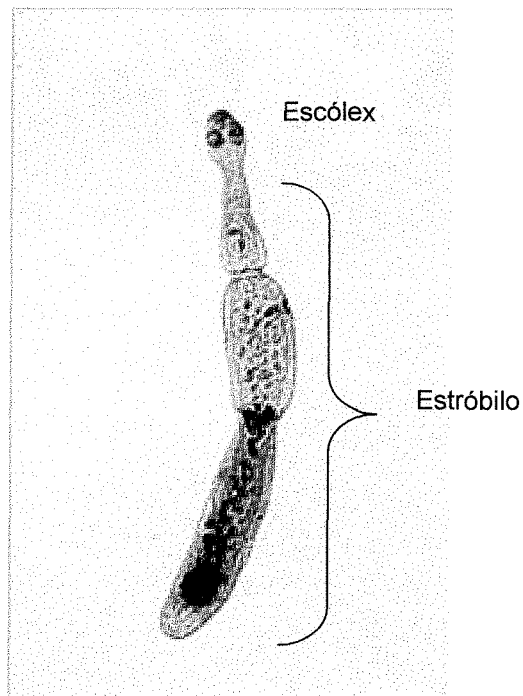


Figura 1.1. Adulto de *Echinococcus granulosus*

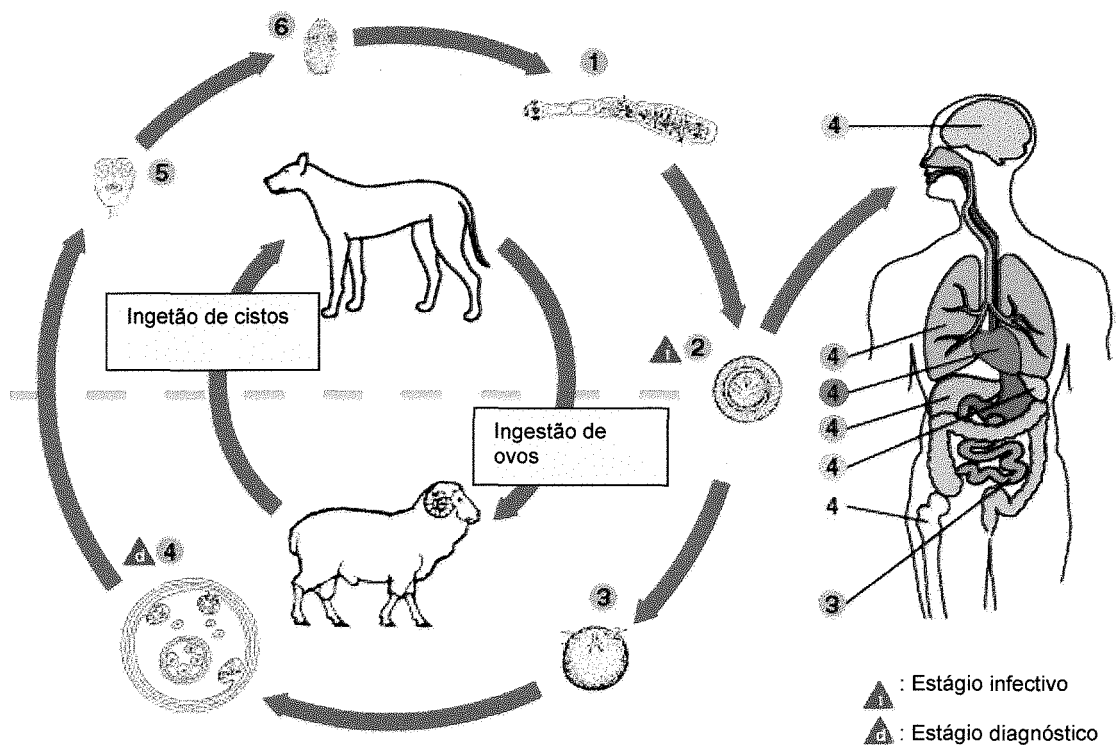


Figura 1.2. Ciclo vital do *Echinococcus granulosus*. ❶ O adulto do *E. granulosus* (2 a 11 mm de comprimento) reside no intestino delgado do hospedeiro definitivo (cães domésticos e outros canídeos). ❷ As proglótides grávidas liberam ovos que são eliminados nas fezes. Após ingestão por um hospedeiro intermediário adequado (ovinos, suínos, camelos, cavalos, etc.), os ovos eclodem no intestino delgado e liberam a ❸ oncosfera que penetra na parede do intestino e migra através do sistema circulatório para vários ❹ órgãos, especialmente fígado e pulmões. Nesses órgãos se desenvolve em um cisto que aumenta gradualmente, produzindo ❺ protoescólices e hidátides filhas que preenchem o interior do cisto. O hospedeiro definitivo se infecta por ingestão de cistos existentes nos órgãos dos hospedeiros intermediários infectados. Após a ingestão, os ❻ protoescólices evaginam, fixam-se à mucosa intestinal e transformam-se em vermes adultos. Humanos infectam-se pela ingestão de ovos, com resultante liberação de ❸ oncosferas no intestino delgado e desenvolvimento de cistos em ❹ diversos órgãos.

Modificado Internet, CDC- Centers for Disease Control and Prevention – Division of Parasitic Diseases (DPD).

Site: <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/alveolarhydatid/default.htm>

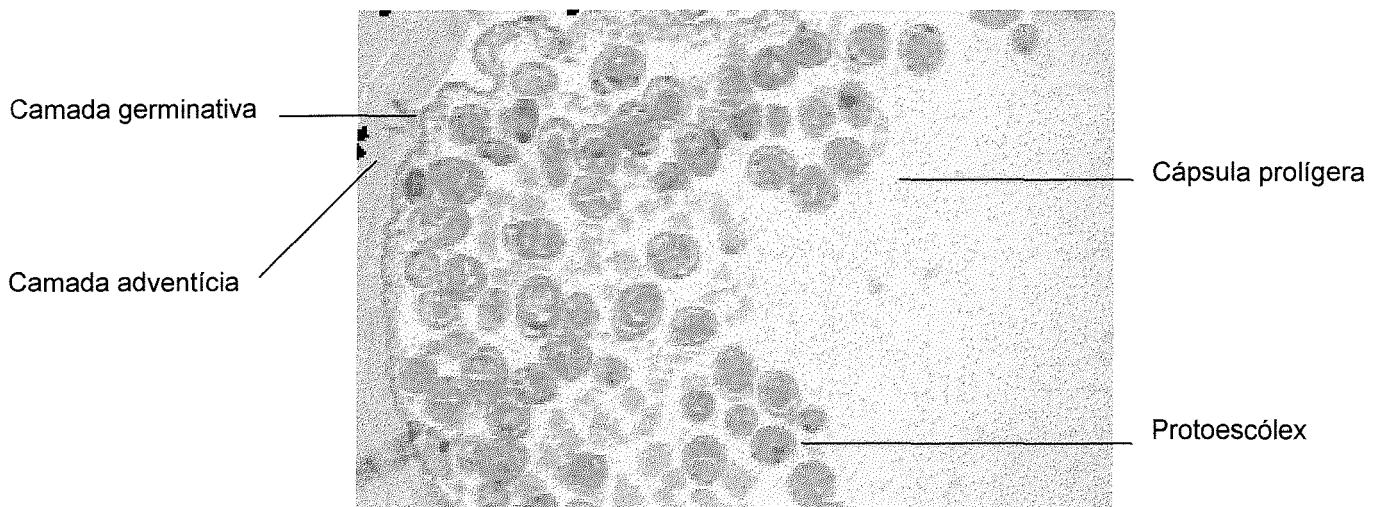


Figura 1.3. Metacestóide de *E. granulosus*. Corte de cisto hidático mostrando os diferentes componentes do estágio larval do parasito. Corado hematoxilina-eosina.

Modificado Internet, Ohio State University – Parasites and Parasitological Resources.

Site: <http://www.biosci.ohio.state.edu/~parasite/home/html>

Quatro espécies foram descritas no gênero *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthrus* e *E. vogeli* (THOMPSON, 1995). *E. granulosus* e *E. multilocularis* são as duas espécies epidemiologicamente mais importantes, sendo as responsáveis pela maioria dos casos da doença em humanos (Mc MANUS & SMYTH, 1986).

E. granulosus Batsch, 1786, um pequeno platelminto parasita, pertencente à classe Cestoda (ordem Cyclophyllidae, família Taeniidae) tem no cão doméstico e em outros canídeos seus hospedeiros definitivos, enquanto mais de 50 espécies diferentes, principalmente ungulados (especialmente ovinos e bovinos), marsupiais e primatas (incluindo o homem) podem servir como hospedeiros intermediários natural ou experimentalmente (SMYTH & SMYTH, 1964).

Existem fortes evidências para a existência de pelo menos 9 cepas de *E. granulosus* adaptadas aos hospedeiros, a maioria das quais com ampla distribuição geográfica. Muito sobre a variabilidade reportada em *Echinococcus* tem uma base genética, embora variações induzidas pelo hospedeiro refletidas em diferenças morfológicas e bioquímicas têm sido verificadas. Portanto, algumas cepas adaptadas aos hospedeiros têm sido caracterizadas tanto genética como fenotipicamente e tem se verificado que muitas das variações genéticas exibidas por *Echinococcus* não se refletiram fenotipicamente, porém são importantes para estudos em genética de populações (THOMPSON, 1995). Conforme McMANUS & SMYTH (1986), as diferenças entre as cepas de *E. granulosus* representam um dos pontos principais a serem considerados em qualquer estudo epidemiológico visando ao posterior estabelecimento de programas para o controle da hidatidose. Estas diferenças não só refletem distintas características biológicas, com importantes implicações em

estudos sorológicos a nível populacional e no desenvolvimento futuro de estratégias para quimioterapia e vacinação, como também podem refletir o potencial infectivo das diversas cepas para o homem.

O hospedeiro definitivo adquire a infecção por ingestão de protoescólices viáveis quando o animal ingere um cisto hidático fértil. Entre 6 horas e 3 dias ocorre a completa evaginação dos protoescólices e a fixação do verme adulto jovem na mucosa do intestino delgado através das ventosas e dos acúleos. O parasito maduro é hermafrodita, produzindo ovos por autofecundação, o sistema reprodutivo predominante das populações de *Echinococcus* (HAAG *et al.* 1998, 1999). LYMBERY *et al.* (1989) verificaram um comportamento agregativo em *E. granulosus*, provavelmente como resultado de uma atração individual entre os vermes no intestino de cães experimentalmente infectados. Este comportamento pode contribuir para aumentar a fertilização cruzada entre os vermes, mas há também uma outra explicação plausível para isso: a de que esta agregação serviria para aumentar a qualidade ambiental tal como facilitar a fixação ou aumentar as concentrações de nutrientes. Análises eletroforéticas da estrutura genética de *E. granulosus* de hospedeiros domésticos na Austrália sugeriram que tanto a autofecundação como a fertilização cruzada ocorrem em populações naturais (LYMBERY & THOMPSON, 1988). Certamente, os requerimentos para fertilização em *Echinococcus* parecem ser extremamente complexos como sugerido pelas repetidas falhas em se conseguir a fertilização *in vitro* (SMYTH & DAVIES, 1974; SMYTH, 1979). Tem sido sugerido que talvez hajam fatores específicos ou inespecíficos nas secreções intestinais do hospedeiro que ativam o cirro a começar seus movimentos copulatórios e que sem tais estímulos a autofecundação pode não ocorrer (SMYTH, 1982).

O estróbilo do parasito adulto possui normalmente 3 segmentos, denominados proglotes, que se apresentam em diferentes estágios de diferenciação. A proglote terminal ou grávida possui o útero repleto de ovos. Esta proglote destaca-se do restante do estróbilo (apólise) e vai desintegrar-se no intestino grosso, liberando os ovos que são eliminados com as fezes do hospedeiro.

O ovo de *E. granulosus* tem forma esférica ou elipsóide com tamanho dos seus diâmetros variando de 30 a 50 μm e 22 a 44 μm . O embrióforo é composto por blocos poligonais de uma proteína semelhante à queratina, unidos por uma substância cimentante (MORSETH, 1965; MORSETH, 1966) conferindo ao ovo grande resistência. Quando liberados do hospedeiro definitivo, os ovos estão presumivelmente maduros e infectivos (THOMPSON, 1995).

Após ingerido pelo hospedeiro intermediário, o ovo sofre a ação de enzimas proteolíticas, no estômago e/ou no intestino, e libera a oncosfera. A oncosfera é ativada e prende-se às vilosidades do intestino delgado através de acúleos. A sua penetração na mucosa intestinal ocorre com o auxílio dos acúleos e, possivelmente, secreções glandulares. Após a penetração, migra por via linfática ou venosa (HEATH, 1971), até atingir um sítio definido onde começa a se diferenciar, normalmente até o 14^o dia após a infecção (THOMPSON, 1995). Na maioria dos casos, o parasito instala-se no fígado (60-80% dos casos) ou nos pulmões (10-20% dos casos) e, com frequência bem menor, nos rins, no baço, no sistema nervoso central, no coração, nos ossos ou em outros sítios (SCHWABE, 1986; AUER, 1990). Ao atingir estes sítios, a oncosfera inicia um complexo processo de diferenciação até o estágio de metacestóide (cisto hidático). Este processo é iniciado pelo crescimento e divisão de células germinativas situadas no pólo posterior da oncosfera. Posteriormente, células indiferenciadas também presentes na camada germinativa

do cisto hidático são responsáveis pela formação das cápsulas prolíferas, que se originam como pequenas massas nucleares, as quais se proliferam em direção à cavidade do cisto. As cápsulas prolíferas crescem, vacuolizam-se e tornam-se pedunculadas. No interior do seu lume, ocorre a produção de numerosos protoescólices por multiplicação assexuada (THOMPSON *et al.*, 1995).

Resumindo, o produto final da diferenciação da oncosfera é o cisto hidático (metacestóide), que é tipicamente uma estrutura esférica ou subesférica cheia de fluido (líquido hidático), que cresce concentricamente (KROTT & RAUSCH, 1987). O cisto hidático consiste de uma camada germinativa ou prolífera interna, de uma camada laminar intermediária e de uma camada externa, denominada camada adventícia (THOMPSON, 1995). A camada adventícia é produzida pelo hospedeiro, como resposta à presença do cisto (SLAIS & VANEK, 1980).

O líquido hidático é uma mistura complexa de uma série de componentes bioquímicos, orgânicos e inorgânicos, que vão desde íons até proteínas (AGOSIN, 1968; SANCHEZ & SANCHEZ, 1971; FRAYHA & HADDAD, 1980). Além de componentes do parasito, estão também presentes alguns componentes bioquímicos do hospedeiro, como albumina e imunoglobulinas (COLTORTI & VARELA-DÍAZ, 1972; COLTORTI & VARELA-DÍAZ, 1975; HUSTEAD & WILLIAMS, 1977).

A longevidade de um cisto depende de inúmeros fatores e é bastante variável, existindo registros de cistos com 16 anos em cavalos e com 53 anos no homem (THOMPSON, 1995).

Um processo de diferenciação semelhante ao que dá origem às cápsulas prolíferas ocorre na formação dos protoescólices (THOMPSON, 1995; ROGAN & RICHARDS, 1987), que se formam no interior das cápsulas prolíferas. Uma vez

completamente desenvolvido, o protoescólex permanece num estado dormente no interior do cisto hidático, até que a integridade do cisto seja rompida (THOMPSON & LYMBERY, 1990). Dano físico ou imunológico ao cisto pode resultar na exposição dos protoescólices a componentes específicos e/ou não específicos do sistema de defesa humoral do hospedeiro acarretando sua morte. A contaminação bacteriana intracística também pode surgir como uma complicação em pacientes com hidatidose cística (THOMPSON, 1995). Protoescólices liberados com a ruptura do cisto podem ainda sofrer um processo de vesicularização, dando origem a novos cistos hidáticos, chamados de secundários (KUMARATILAKE & THOMPSON, 1983; THOMPSON & LYMBERY, 1990; AL NAHHAS *et al.*, 1991).

O ciclo vital de *E. granulosus* se completa quando protoescólices viáveis são ingeridos por um hospedeiro definitivo adequado. Ocorre então a digestão do cisto hidático, ficando o protoescólex protegido da ação de enzimas proteolíticas do hospedeiro por um revestimento mucopolissacarídico (MARCHIONDO & ANDERSEN, 1983), até que seja estimulado, por mecanismos ainda não bem conhecidos, a evaginar. Os protoescólices evaginados, inicialmente muito ativos, penetram profundamente entre as vilosidades do quarto anterior do intestino delgado (THOMPSON & ECKERT, 1983). Nesta fase, o *E. granulosus* jovem é capaz de mover-se entre vilosidades adjacentes, enquanto o verme adulto, após atingir a maturidade, parece estar confinado a um sítio particular (THOMPSON *et al.*, 1979). O verme maduro possui o rostelo profundamente inserido numa cripta de Lieberkühn, com os acúleos penetrando na mucosa e as ventosas fortemente aderidas à base das vilosidades (THOMPSON *et al.*, 1979; THOMPSON & ECKERT, 1983). Um *E. granulosus* adulto leva cerca de 40 dias para se formar, apresentando

ao final deste período, um estróbilo contendo 3 a 5 segmentos, o último deles com ovos embrionados.

A hidatidose cística ou unilocular é a infecção de um hospedeiro intermediário pelo metacestóide de *E. granulosus*. O cisto hidático é a forma patogênica do *E. granulosus*, uma vez que a presença do verme adulto no hospedeiro definitivo é virtualmente assintomática (THOMPSON *et al.*, 1979; THOMPSON, 1995). As manifestações clínicas da doença (revisadas por SCHANTZ, 1989) resultam do crescimento da massa cística ou de reações de hipersensibilidade. Os sintomas são decorrentes de uma lesão invasiva, que compromete a função do órgão lesado e causa compressão em órgãos e tecidos vizinhos, e dependem, fundamentalmente, da localização do cisto. Nos casos mais comuns de cistos hidáticos hepáticos ou pulmonares, o hospedeiro começa a apresentar sintomas clínicos quando os cistos atingem cerca de 10 cm de diâmetro. Por outro lado, o rompimento eventual do cisto, com a subsequente liberação do conteúdo do mesmo, pode precipitar uma reação anafilática, que pode variar em severidade desde uma simples urticária até um choque fatal (WERCZBERGER *et al.*, 1979). Além disso, pode-se ter a formação de cistos hidáticos secundários, como já mencionado anteriormente.

A hidatidose é uma doença de distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em locais com grande criação de ovinos, principal hospedeiro intermediário de *E. granulosus*. Esses locais que constituem áreas endêmicas, incluem sul e leste da Austrália, Europa, Ásia Central e América do Sul (MATOSSIAN *et al.*, 1977), particularmente Uruguai e Argentina, que são considerados os maiores focos de infecção do mundo (HUGGINS *et al.*, 1989). A hidatidose cística é a zoonose de maior importância em saúde pública na América

Latina. A região dos Andes e do Cone Sul têm sido reconhecidas como áreas endêmicas de hidatidose cística (ARAMBULO III, 1997).

Na Argentina 3 regiões exibem altas taxas de transmissão de hidatidose cística aos humanos: a Patagônia, os Pampas (ao sul da Província de Buenos Aires) e a costa (Província de Corrientes).

No Chile as áreas mais afetadas localizam-se ao sul, causando grande impacto econômico e social (ARAMBULO III, 1997).

Estudos epidemiológicos realizados no Uruguai revelaram que o índice de hidatidose hepática em populações rurais é o maior a nível mundial (PERDOMO, 1987).

No Brasil o estado do Rio Grande do Sul é considerado zona endêmica de hidatidose, sendo esta um sério problema de saúde pública, especialmente nos municípios que fazem fronteira com o Uruguai e a Argentina, onde o rebanho de ovinos é significativo. Apesar disso os dados sobre prevalência da enfermidade na região são bastante limitados. Para o período de 1977-1993, a média anual de prevalência de hidatidose entre os animais abatidos nos estabelecimentos com inspeção federal no Rio Grande do Sul foi de 31% nos bovinos, 19% nos ovinos e 0,64% nos suínos. Poucos casos isolados de hidatidose cística em humanos têm sido reportados no Rio Grande do Sul. No período de 1973-1984, um total de 470 casos de hidatidose cística em humanos foram reportados no estado do Rio Grande do Sul (ARAMBULO III, 1997).

No Peru, a hidatidose é considerada uma doença rural, porém sua ocorrência em áreas urbanas tem se tornado significante devido à introdução de cães infectados com *E. granulosus* trazidos por populações migrantes vindas de áreas endêmicas (ARAMBULO III, 1997).

A alta incidência de hidatidose nessas regiões ocorre devido à prática comum de abate de animais (ovinos e bovinos, principalmente) onde, posteriormente, as vísceras cruas são fornecidas como alimento aos cães. Estando essas vísceras contaminadas com um cisto hidático fértil, o cão torna-se infectado e o ciclo repete-se.

Assim, a dinâmica da transmissão de *Echinococcus* é determinada por fatores extrínsecos (temperatura, umidade e agentes de dispersão) e intrínsecos à interação parasito-hospedeiro (virulência do parasito e imunidade do hospedeiro). Além disso, fatores sócio-econômicos, como as práticas adotadas nas fazendas (manejo e alimentação dos animais), a legislação vigente e o nível de instrução da população também contribuem para uma maior ou menor taxa de transmissão do parasito (GEMMEL, 1990). Por isso, em praticamente todos os centros de endemismo de *E. granulosus* têm se realizado programas de controle, que consistem na educação da população quanto a cuidados de higiene, ao hábito de alimentar os cães com as vísceras de animais (a hidatidose seria praticamente inexistente, restringindo-se apenas aos ciclos silváticos, se o hábito de alimentar os cães com vísceras cruas e contaminadas fosse eliminado) e do tratamento dos hospedeiros definitivos com praziquantel. Algumas vacinas já foram propostas (CHABALGOITY *et al.*, 1997; GOTTSTEIN *et al.*, 1990; HEATH & LAWRENCE, 1996; LIGHTOWLERS *et al.*, 1996). O objetivo é reduzir a taxa de incremento líquido da população do estado hiperendêmico ou endêmico para o de extinção, e mantê-la nesse nível até que a transmissão tenha cessado. LIGHTOWLERS *et al.* (1999), testaram em ovelhas a vacina recombinante EG95 contra hidatidose cística. Esta vacina foi baseada em um antígeno recombinante clonado de ovos (oncosferas) do parasito (LIGHTOWLERS *et al.*, 1996). A vacinação com EG95 conferiu alto grau de proteção (96 – 100%)

contra desafios de 3 isolados testados (da Nova Zelândia, da Austrália e da Argentina) reduzindo o número de cistos viáveis em 99,3%, comparado com controles não vacinados. Esses resultados sugerem que EG95 poderia ter ampla aplicabilidade como uma nova ferramenta para uso em campanhas de controle da hidatidose.

O diagnóstico da hidatidose é em geral tardio, já que o período que decorre desde a infecção até o aparecimento dos sintomas pode variar de 2 até 20 anos ou mais e que as manifestações clínicas são inespecíficas e aparecem quando o cisto já apresenta um tamanho considerável, difícil de ser tratado com quimioterápicos.

Vários métodos têm sido usados para o diagnóstico da hidatidose humana. Métodos físicos como ultra-sonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, entre outros, são inespecíficos e pouco eficientes no diagnóstico precoce. Testes imunológicos são mais específicos e baseiam-se na resposta imune do hospedeiro a antígenos da fase larval do parasito. Sabe-se que pacientes infectados por *E. granulosus* produzem altos níveis de anticorpos circulantes contra o parasito (RICKARD & LIGHTOWLERS, 1986), porém um diagnóstico sorológico preciso de infecção com *Echinococcus* é difícil devido a reações cruzadas com várias outras espécies de helmintos. Os avanços das técnicas de imunodiagnóstico estão estreitamente relacionados com a caracterização de antígenos parasitários.

A cirurgia é a principal forma de tratamento após estabelecer-se um diagnóstico por métodos de imagem, possibilitando a cura em 50 a 90% dos casos (SCHANTZ *et al.*, 1982), dependendo do número e localização dos cistos, severidade e seleção dos casos e também das técnicas aplicadas. Atualmente a quimioterapia com benzimidazólicos apresenta-se como uma alternativa real ao tratamento cirúrgico de uma série de casos de hidatidose, incluindo pequenos cistos

precocemente diagnosticados (TODOROV *et al.*, 1990; WEN *et al.*, 1993). Todavia, o tratamento com estas drogas traz problemas de toxicidade, como hepatite e depressão da atividade da medula óssea, sendo por isso, aconselhado apenas em casos onde a cirurgia torna-se impraticável (DAVIS *et al.*, 1986). O diagnóstico precoce da hidatidose humana é importante e resulta em reduzida morbidade, fruto de uma intervenção precoce. O diagnóstico antes de uma cirurgia é freqüentemente confirmado com detecção de anticorpos específicos (SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986a) e já é sabido que testes sorológicos têm identificado pacientes com hidatidose assintomática em áreas endêmicas (MLIKA *et al.*, 1986; COLTORTI *et al.*, 1988).

1.2. Antígenos parasitários

Os antígenos da camada germinativa e dos protoescólices podem induzir à produção de um amplo espectro de anticorpos específicos. Anticorpos anti-*Echinococcus* de todas as classes e subclasses podem ocorrer em pacientes com hidatidose, e vários testes imunodiagnósticos têm sido aplicados para detecção destes anticorpos (SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986a; DI FELICE & SIRACUSANO, 1987).

Tradicionalmente, o fluido cístico tem sido usado como fonte de antígenos para o sorodiagnóstico (TASSI *et al.*, 1981; CRAIG & RICKARD, 1981). A análise deste fluido tem revelado a presença de antígenos do parasito relacionados com antígenos de outros helmintos, assim como componentes séricos do hospedeiro (SANCHEZ & SANCHEZ, 1971). A presença destes contaminantes no fluido do cisto

tem limitado sua utilização para o diagnóstico específico de *E. granulosus*, de tal forma que se tem encontrado cerca de 6 a 25% de “falsos negativos” e entre 5 e 15% de “falsos positivos” com todas as técnicas usadas até o momento (BARBIERI *et al.*, 1994).

A identificação inicial dos componentes antigênicos do metacéstóide de *E. granulosus* foi feita através de técnicas de dupla difusão em ágar e imunoelektroforese, utilizando soros de hospedeiros infectados e de animais imunizados (KAGAN & NORMAN, 1961; CHORDI & KAGAN, 1965; VARELA-DÍAZ *et al.*, 1974). Assim, foram definidos pelo menos 10 componentes parasitários, dos quais dois, dominantes nas preparações foram considerados específicos. A terminologia usada para cada um destes antígenos varia de autor para autor e é discutida por RICKARD & LIGHTOWLERS (1986). Esses autores utilizam, como neste trabalho, as designações de antígeno 5 (CAPRON *et al.*, 1967) e antígeno B (ORIOLO *et al.*, 1971). Estes dois antígenos são lipoproteínas, sendo que o antígeno 5 é sensível à temperatura e a agentes redutores, enquanto que o antígeno B não é afetado por nenhum desses agentes.

O antígeno 5 possui uma massa molecular em torno de 400 kDa (POZZUOLI *et al.*, 1972). Análises em géis de poliacrilamida-SDS sob condições redutoras mostram que o antígeno 5 tem uma subunidade principal de aproximadamente 38 kDa (DI FELICE *et al.*, 1986; SHEPHERD & McMANUS, 1987) e possivelmente uma subunidade menor com massa molecular de aproximadamente 20 kDa (SHEPHERD & McMANUS, 1987). É encontrado na porção interna da camada germinal, na parede das cápsulas prolíferas, no parênquima dos protoescólices e nos dutos coletores do sistema excretor (RICKARD *et al.*, 1977; YARZABAL *et al.*, 1976, 1977; DAVIES *et al.*, 1978).

O antígeno B possui uma massa molecular de aproximadamente 120-160 kDa (ORIOLO & ORIOLO, 1975; ORIOLO *et al.*, 1971; POZZUOLI *et al.*, 1972). Está presente em células tegumentares e corpúsculos calcáreos de protoescólices, nas camadas germinativa e laminar do cisto e substância intersticial das cápsulas prolíferas (YARZABAL *et al.*, 1977). Em termos quantitativos, a concentração relativa do antígeno B no líquido hidático é 10 vezes maior do que a do antígeno 5, e esta relação parece ser constante e independente tanto da localização do cisto como da espécie hospedeira (MUSIANI *et al.*, 1978)

Segundo LIGHTOWLERS *et al.* (1989), o antígeno B é representado por um grupo de moléculas de tamanho regularmente espaçado, com a subunidade menor estimada em 8 kDa e os outros componentes com massa molecular diferindo em aproximadamente 8 kDa, isto é, 16 kDa, 24 kDa, 32 kDa, etc; todos possivelmente derivados do monômero de 8 kDa, sugerindo que o antígeno B é um polímero de uma subunidade de 8 kDa. O mesmo autor mostrou que a abundância relativa das diferentes subunidades diminui com o aumento do seu peso molecular.

A detecção por imunoblot da menor subunidade (8 kDa) do antígeno B apresenta-se como uma boa ferramenta para diagnóstico da hidatidose (MADDISON *et al.*, 1989; LEGGATT *et al.*, 1992). Apesar disso, MADDISON *et al.* (1989) verificaram que 18% dos soros de pacientes com hidatidose cística testados, não reagiram com esta subunidade e 39% dos soros de pacientes com hidatidose alveolar (*E. multilocularis*) apresentaram reação com a mesma subunidade que foi considerada *Echinococcus* específica.

Uma série de antígenos foi também identificada e analisada quanto à especificidade por KANWAR *et al.* (1992) em preparações de líquido hidático de diversas origens, em imunoblot, em condições redutoras, sem relacioná-las,

entretanto, às subunidades dos antígenos 5 e B. Foram verificados por estes autores, polipeptídeos com 16, 24, 38, 45 e 58 kDa reconhecidos tanto por soros específicos como por diversos soros de pacientes com outras infecções, inclusive cisticercose, e dois outros antígenos, um com 8 kDa e outro com 116 kDa, reconhecidos apenas por soros específicos. Um antígeno de 48 kDa não relacionado nem ao antígeno 5 e nem ao antígeno B foi ainda isolado por AL-YAMAN & KNOBLOCH (1989), e em testes com uma bateria de soros de pacientes com infecções parasitárias heterólogas, foi reconhecido apenas por alguns soros de pacientes com hidatidose alveolar.

Uma avaliação do potencial diagnóstico de antígenos provenientes de extratos de vermes adultos de *E. granulosus* foi realizada por ERSFELD *et al.* (1997). A análise dos extratos de vermes adultos por ELISA mostraram uma sensibilidade de 83% para hidatidose cística a qual é comparável a dados obtidos em testes sorodiagnósticos com líquido hidático. Verificou-se através de imunoprecipitação, que o mRNA do verme adulto de *E. granulosus* traduzido *in vitro* revelou uma variedade de proteínas antigênicas de baixa massa molecular (12-45 kDa) reconhecidas pelo soro humano de pacientes com hidatidose cística. Portanto, os mesmos autores concluíram que vermes adultos de *E. granulosus* podem ser considerados uma fonte adicional ou alternativa ao material proveniente de metacestóides para isolamento de antígenos nativos ou recombinantes que poderão ser usados no diagnóstico da hidatidose.

ITO *et al.* (1999) utilizaram líquido hidático de *E. granulosus* enriquecido com a fração de 8 kDa do antígeno B e extrato de protoescólices de *E. multilocularis* enriquecido com a fração EM18 para estabelecer o diagnóstico diferencial entre hidatidose cística e alveolar através de imunoblot em uma bateria de 354 amostras

de soro, incluindo 66 amostras de pacientes com hidatidose alveolar originários de 4 diferentes zonas endêmicas, 173 soros de pacientes com hidatidose cística provenientes de 7 diferentes áreas endêmicas e o restante de indivíduos com outras parasitoses, com hepatomas e saudáveis. Os achados desse trabalho confirmaram que o antígeno B (8 kDa) não é espécie-específico conforme havia sido sugerido por SHEPHERD & McMANUS (1987) e por SIRACUSANO *et al.* (1991), mas é gênero-específico para *Echinococcus* (LIGHTOWLERS *et al.*, 1989, MADDISON *et al.*, 1989) e que o antígeno EM18 é um adequado marcador sorológico para diferenciar hidatidose alveolar de hidatidose cística.

1.2.1. Antígenos recombinantes

O imunodiagnóstico efetivo da hidatidose depende de grandes quantidades de antígenos parasitários espécie-específicos bem caracterizados, cuja disponibilidade é em geral limitada. Dificuldades no suprimento de preparações antigênicas, na variabilidade das fontes de antígeno de líquido hidático e também pelo fato do líquido hidático provavelmente conter componentes séricos do hospedeiro têm se apresentado como problemas para a aplicação do imunodiagnóstico em larga escala (HEMMINGS & McMANUS, 1991; CHAMEKH *et al.*, 1992). Mesmo com o nível de conhecimento que já se dispõem sobre os antígenos de *E. granulosus*, o que já permitiria seu uso em testes imunodiagnósticos com certa confiabilidade, ainda são necessários mais estudos visando à identificação de outros antígenos, à caracterização de epitopos antigênicos

específicos e ao estabelecimento do papel funcional que as proteínas antigênicas identificadas exercem na biologia de *E. granulosus*. Nestes aspectos as técnicas de DNA recombinante associadas à produção de anticorpos monoclonais oferecem boas perspectivas, além de representarem alternativas importantes para a solução de problemas relacionados ao controle de qualidade e ao suprimento de antígenos derivados diretamente de cistos hidáticos. Estas técnicas vêm sendo amplamente utilizadas na identificação e caracterização de antígenos para o imunodiagnóstico de diversas infecções parasitárias.

Diversos genes de *Echinococcus* foram caracterizados, sendo que na sua maioria, codificam proteínas antigênicas, e foram isolados a partir de *screenings* imunológicos de bancos de expressão utilizando soros de pacientes infectados. Proteínas importantes foram assim identificadas e funcionalmente caracterizadas (FERREIRA *et al.*, 1996). Além disso, muitos desses antígenos constituem componentes importantes da biologia do parasito e podem ser de interesse para utilização em vacinação, em imunoterapia ou como alvos potenciais para quimioterapia. Alguns exemplos são citados a seguir.

LIGHTOWLERS *et al.* (1989a) clonaram uma sequência que codifica um antígeno com semelhança à ciclofilina, enquanto FACON *et al.* (1991) clonaram a sequência de cDNA que codifica um epitopo imunogênico do antígeno 5. SHEPHERD *et al.* (1991) clonaram uma sequência de cDNA que codifica a porção carboxi-terminal da subunidade menor do antígeno B (8 kDa). Este clone foi denominado pelos autores como EgPS-3 e o peptídeo por ele codificado mostrou similaridade limitada com a sequência de α -1 antitripsina de babuínos e humanos. Os mesmos autores verificaram que o componente nativo purificado de 8 kDa inibia a atividade da elastase e também inibia a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. O

peptídeo EgPS-3, foi expressado como uma proteína de fusão a GST e possibilitou a detecção de anticorpos em pacientes com hidatidose (88 soro-positivos em 119 pacientes). Porém, reações cruzadas foram observadas em 25% de soros de pacientes com hidatidose alveolar e em 22% de pacientes com esquistossomose japônica (LEGGATT & McMANUS, 1994). CHAMEKH *et al.* (1992), descreveram a clonagem molecular e seqüenciamento de um gene de *E. granulosus*, cujo produto foi identificado por um anticorpo monoclonal contra um epitopo do antígeno 5.

Um clone do cDNA correspondente ao componente de 8 kDa do antígeno B, foi isolado por HELBIG *et al.* (1993). Este clone, denominado EG55, foi isolado de uma biblioteca de expressão de cDNA do estágio larval de *E. granulosus* por *immunoscreening* com um *pool* de soros obtidos de pacientes com hidatidose cística. EG55, expressado como uma proteína de fusão à GST, apresentou uma sensibilidade e especificidade, em ELISA, de 89,1% e 98,6% respectivamente. O uso deste antígeno combinado com um antígeno recombinante de *E. multilocularis* (EM10) revelou um modo altamente sensível e específico de diferenciar a hidatidose cística e a hidatidose alveolar. O clone EG55 codifica um peptídeo de 81 aminoácidos, que apresenta uma porção N-terminal hidrofóbica seguida por dois sinais eucarióticos de clivagem por peptidase, indicando que o antígeno B é uma proteína secretória.

LIGHTOWLERS *et al.* (1989), haviam sugerido que o antígeno B poderia ser um homopolímero de uma subunidade de 8 kDa que seria possivelmente codificado pela seqüência de EG55 (FROSCH *et al.*, 1994). Entretanto, FERNÁNDEZ *et al.* (1996) isolaram um clone (3C3) que codifica uma subunidade diferente relacionada ao antígeno B. O clone 3C3 foi isolado de uma biblioteca de cDNA de protoescólices de *E. granulosus*. O procedimento de *screening* usou um antisoro hiperimune de

coelho contra uma fração lipoproteica enriquecida de líquido hidático bovino. O inserto completo do clone 3C3 codifica um peptídeo de 90 aminoácidos (EgAgB8/2 ou simplesmente AgB8/2) que apresenta uma porção N-terminal hidrofóbica, como aquela encontrada no peptídeo derivado de EG55, a qual poderia constituir um peptídeo sinal. AgB8/2 apresentou 44% de identidade a nível de aminoácidos com o peptídeo codificado por EG55 (agora denominado EgAgB8/1 ou simplesmente AgB8/1) e 40% de similaridade ao nível de nucleotídeos. Um anticorpo policlonal monoespecífico contra AgB8/2 reconheceu, em imunoblot, todos os três principais componentes do antígeno B (8, 16 e 24 kDa). GONZÁLEZ *et al.* (1996) mostraram que ambas as subunidades (AgB8/1 e AgB8/2) estavam presentes na banda de 8 kDa observada em SDS-PAGE e que estas poderiam se constituir nos blocos para a construção das subunidades maiores do antígeno B que poderia então ser um heteropolímero de pelo menos 2 pequenas subunidades de semelhantes massas moleculares. É interessante observar que moléculas com estas características têm sido encontradas em outras espécies de parasitas (POOLE *et al.*, 1992; OSSORIO *et al.*, 1994). As seqüências AgB8/1 e AgB8/2 mostraram uma porção hidrofóbica da posição 1 a 16 e 1 a 20, respectivamente, seguida por um potencial sinal eucariótico de clivagem por peptidase (VON HEIJNE, 1986). Isto indica que ambos os polipeptídeos (AgB8/1 e AgB8/2) poderiam ser proteínas secretadas.

MÜHLSCHLEGEL *et al.* (1993), isolaram diversos clones de uma biblioteca de cDNA de *E. granulosus* usando um antisoro de coelho contra o antígeno larval total. Um dos clones isolados (EG36) possuía um inserto codificando uma proteína de 863 aminoácidos que mostrou 71,4% de identidade à paramiosina de *Schistosoma mansoni*. Além disso, uma seqüência peptídica de 17 aminoácidos da proteína EG36 apresentou um significativo nível de homologia ao antígeno B de *Taenia solium* (não

relacionado ao antígeno B de *E. granulosus*). EG36 foi expressado em pGEX-3X e o produto de fusão EG36-GST foi usado para obtenção de soro hiperimune de coelho. Este soro permitiu a localização da proteína no tegumento de *E. granulosus* e na larva de *E. multilocularis*. Alguns soros de pacientes com hidatidose cística e alveolar, com esquistossomose e neurocisticercose reagiram com o EG36-GST purificado em testes de ELISA.

ESTEVEES *et al.* (1993), isolaram um cDNA estágio específico de uma biblioteca de expressão de *E. granulosus* através de *screening* diferencial com anticorpos. Este cDNA codifica uma proteína de 134 aminoácidos denominada EgDf1 que é expressa no tegumento de protoescólices e mostra significativo grau de homologia à família de proteínas de baixo peso molecular envolvidas na ligação de ligantes hidrofóbicos. Não há evidências de que esta molécula seja imunogênica em hospedeiros infectados com *E. granulosus*. Em trabalhos mais recentes, a EgDf1 foi estudada em outros aspectos tais como sua estrutura tridimensional, cujos resultados sugerem localizações definidas de regiões epitópicas na estrutura secundária, motivos de fosforilação consenso e ácido oleico como um bom candidato a ligante a EgDf1 (PAULINO *et al.*, 1998). Ainda, a EgDf1 descrita como uma *fatty acid-binding protein* (FABP) de *E. granulosus* (ESTEVEES *et al.*, 1997) foi expressada em cepas de vacina de *Salmonella* como uma fusão C-terminal ao fragmento C da toxina tetânica (TetC) usando o vetor de expressão pTECH. Esta proteína de fusão vem sendo estudada para avaliar seu uso como potencial vacina contra *E. granulosus* (CHABALGOITY *et al.*, 1997).

FERREIRA (1993), isolou 8 clones recombinantes de uma biblioteca de cDNA de *E. granulosus* usando um pool de soros de pacientes com hidatidose cística. Quatro desses clones foram pelo menos parcialmente caracterizados. O clone

AgEg4 possuía um cDNA que codifica um peptídeo de 332 aminoácidos e mostrou 57,9% de identidade a uma isoforma citosólica de malato desidrogenase (MDH) de camundongo e suíno (RODRIGUES *et al.*, 1993). A MDH de *E. granulosus* foi expressa em *E. coli* como um produto de fusão à GST e demonstrou ser funcional. A presença de epitopos conformacionais em Ag4-GST foi também evidenciada (FERREIRA & ZAHA, 1994). Verificou-se, além disso, que este antígeno possuía uma sensibilidade diagnóstica de 50% em ELISA e que poderia elucidar reações cruzadas com soro de pacientes com cisticercose (FERREIRA & ZAHA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994). Outro clone, o AgEg8, possuía um cDNA parcial codificando uma seqüência de 111 aminoácidos que revelou limitado grau de homologia (27-30%) a proteínas que ligam filamentos de actina, tais como a gelsolina, severina e vilina (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995). Mais recentemente, o cDNA completo do clone AgEg8 (atualmente denominado EgAFFP1-3), HERRERA, 1999/2000 submetido) foi obtido. Este cDNA codifica uma seqüência de 370 aminoácidos, liga monômeros de actina e também realiza funções semelhantes ao grupo das *Actin Binding Proteins* (ABP) (HERRERA *et al.*, 1999). O peptídeo de fusão Ag8-GST mostrou uma sensibilidade diagnóstica de 55,5% em ELISA e apresentou algumas reações cruzadas com soros de pacientes portadores de outras helmintoses. O uso de Ag4-GST junto com Ag8-GST elevou a sensibilidade do teste para 66,7% (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995). Dois outros clones, AgEg5 e AgEg6 possuíam insertos parciais de DNA que codificam proteínas ligantes de cálcio (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995; CHEMALE, 1995, 1998). A seqüência deduzida do clone AgEg5 possuía 80 aminoácidos e tinha 2 motivos putativos *EF-hand Ca²⁺-binding*. A atividade de ligação ao cálcio foi experimentalmente confirmada (FERREIRA *et al.*, 1995;

CHEMALE, 1995). O peptídeo Ag5 possuía uma sensibilidade diagnóstica de 48% e apresentou reações cruzadas com alguns soros de pacientes com outras helmintoses. O clone AgEg6 codificava um peptídeo de 338 aminoácidos e não apresentou valor diagnóstico (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995). O clone Ag6 foi isolado devido à presença de um único soro que reagiu com este antígeno no *pool* de soros pré-absorvidos (FERREIRA *et al.*, 1994). Este peptídeo apresentou um arranjo não usual de 16 motivos putativos *EF-hand Ca²⁺- binding*, cuja funcionalidade foi demonstrada por um ensaio de ligação a cálcio com a proteína de fusão Ag6-GST (FERREIRA *et al.*, 1995; RODRIGUES *et al.*, 1994). A presença da proteína em corpúsculos calcáreos foi evidenciada por imunohistoquímica utilizando-se anticorpo contra a proteína Ag6-GST (RODRIGUES *et al.*, 1994, RODRIGUES *et al.*, 1997).

FELLEISEN & GOTTSTEIN (1994), isolaram de *E. granulosus*, o gene que codifica a proteína II/3, já isolada anteriormente de *E. multilocularis* e que apresentava elevado potencial imunodiagnóstico. Porém, poucos pacientes com hidatidose cística possuíam em seus soros anticorpos contra a proteína recombinante II/3-10.

Um clone de cDNA de *E. granulosus*, que codifica uma ferritina foi isolado por ERSFELD & CRAIG (1995). Esta proteína contém 173 resíduos de aminoácidos e mostrou 56% de homologia à cadeia pesada de ferritina humana. A ferritina de *E. granulosus* foi traduzida *in vitro* e seu potencial diagnóstico foi determinado por imunoprecipitação; anticorpos específicos foram detectados em 15 de 17 pacientes com hidatidose cística e em 6 de 7 pacientes com hidatidose alveolar. Não foram observadas reações cruzadas com soros de pacientes portadores de outras helmintoses.

McVIE *et al.* (1997) clonaram em vetor de expressão pMal-c2 um fragmento de DNA de 165 pb que codifica parte da subunidade de 12 kDa (8 kDa) do antígeno B de *E. granulosus*. Uma proteína ligadora de maltose de 52 kDa foi produzida e corpos de inclusão contendo esta proteína foram solubilizados em uréia e purificados por afinidade em uma coluna de amilose-sepharose 6B. A imunogenicidade do antígeno recombinante purificado foi testada com soros humanos para detecção de anticorpos IgG4 usando imunoblot, ELISA e dot-ELISA e os resultados comparados ao antígeno B nativo. Ambas as preparações do antígeno B (nativo e recombinante) foram altamente reativas para anticorpos IgG4 humanos em soros de pacientes com hidatidose cística. O recombinante AgB.MBP, mostrou cerca de 65% de sensibilidade na detecção de anticorpos IgG4 no soro de pacientes com hidatidose cística confirmada usando o método de ELISA. Ocorreram reações cruzadas em 33% dos soros de pacientes com hidatidose alveolar, porém não houve reatividade com soros de pacientes com outras helmintoses como esquistossomose, oncocercose e cisticercose e nem com soros de indivíduos não infectados residentes em zonas endêmicas ou não para hidatidose cística. Para o antígeno B nativo, a sensibilidade foi de 63% e a especificidade de 81%. O dot-ELISA para detecção de IgG total incorporando o recombinante AgB.MBP resultou em 74% de sensibilidade e 88% de especificidade para hidatidose cística e 93% de sensibilidade e 65% de especificidade para o antígeno B nativo.

1.2.2. Peptídeos sintéticos

Devido à possível ocorrência na mesma molécula antigênica de alguns epitopos somente reconhecidos por anticorpos em soros de pacientes com

hidatidose cística, a identificação de epitopos específicos de *E.granulosus* em cada antígeno e o desenho do peptídeo sintético apropriado para mimetizá-lo têm sido alvos de estudos nesta área.

CHAMEKH *et al.* (1992) reportaram o uso, em sorologia, de um peptídeo sintético (peptídeo 89-122) mimetizando um epitopo do Ag5. Os autores descreveram que este peptídeo apresentou 85% de sensibilidade e 86% de especificidade. LEGGATT & McMANUS (1994) produziram três peptídeos sintéticos, derivados da seqüência de aminoácidos predita para o clone previamente isolado por SHEPHERD *et al.* (1991), EgPS-3, e que codifica a porção carboxi-terminal da subunidade menor do antígeno B (8 kDa) e mostraram um aumento em especificidade, (4 soros de pacientes com esquistossomose que anteriormente haviam se mostrado positivos com EgPS-3-GST em ELISA, não mostraram uma resposta aos peptídeos em dot-ELISA) mas uma redução na sensibilidade para 68% em pacientes infectados com *E. granulosus*. O epitopo predominantemente reconhecido por anticorpos humanos ocorre nos 27 aminoácidos da porção N-terminal de EgPS-3. Os mesmos autores realizaram a avaliação do potencial diagnóstico deste peptídeo sintético de 27 aminoácidos (peptídeo 65), que mimetiza um epitopo de uma subunidade de 8 kDa do antígeno B e verificaram que apresentou 68% de sensibilidade e 70% de especificidade. A seqüência do AgB8/1 correspondente ao peptídeo 65 está localizada na porção N-terminal que mostra 69% de identidade com o AgB8/2. Segundo LIGHTOWLERS & GOTTSTEIN (1995), o painel de soros de pacientes utilizados em ambos os trabalhos citados acima foram diferentes, o que impediria que fosse estabelecida uma comparação sobre o valor diagnóstico dos dois peptídeos sintéticos por eles utilizados.

BARBIERI *et al.* (1998), analisaram através de ELISA, o potencial diagnóstico de um peptídeo sintético de 34 aminoácidos (peptídeo GU4) em comparação com o antígeno B imunopurificado, com o antígeno 5, bem como com 2 outros peptídeos sintéticos que mimetizam epitopos dos dois últimos antígenos: o peptídeo 89-122 (CHAMEKH *et al.*, 1992) e o peptídeo 65 (LEGGAT & McMANUS, 1994). A seqüência deste peptídeo (GU4) corresponde à porção C-terminal do AgB8/2 a qual mostra somente 29% de identidade com a correspondente região em AgB8/1. Diversos solventes para sensibilização das placas e diversas concentrações de antígeno foram usadas nos testes de ELISA. Verificou-se que a sensibilidade foi bem menor quando se utilizou os peptídeos sintéticos em comparação com os antígenos nativos. Uma explicação que pode ser dada para este fato, é de que ocorreria a perda de epitopos conformacionais quando as seqüências polipeptídicas são removidas do ambiente conferido pelo restante da molécula protéica nativa para aquele promovido pela superfície plástica da placa de ELISA. GRAS-MASSE *et al.* (1988) mostraram que a ligação do anticorpo por peptídeos sintéticos pode estar ligada a sua conformação helicoidal. CHAMEKH *et al.* (1992) mostraram que a ligação de um anticorpo monoclonal anti-Ag5 bem como de alguns soros de pacientes com hidatidose cística, ao epitopo mimetizado pelo peptídeo 89-122 pode ser dependente da conformação em alfa- hélice do antígeno.

1.3. Diagnóstico imunológico da hidatidose humana

Quase todos os testes sorológicos disponíveis têm sido usados para diagnóstico da hidatidose humana. Existem diferenças grandes entre os vários testes, tanto em sua capacidade para detectar anticorpos específicos no soro de

peessoas infectadas (sensibilidade) como na sua capacidade para distinguir pacientes com hidatidose de pacientes com outras parasitoses ou outras desordens clínicas (especificidade).

Entre os testes mais utilizados para o diagnóstico da hidatidose podemos citar reação intradérmica de Casoni (WILLIAMS, 1972), teste de fixação do complemento (KAGAN, 1968; KAGAN, 1978), teste de hemaglutinação indireta (HIRA *et al.*, 1987; MADDISON *et al.*, 1989), teste de aglutinação em látex (KAGAN, 1978). Especial atenção tem sido dada a testes como ELISA, teste de imunofluorescência indireta, testes de imunoprecipitação como imunoeletroforese ou eletrosinereze, imunoblot ou outros testes desenvolvidos ou que incluam modernas técnicas para melhorar a sensibilidade e/ou especificidade de determinado ensaio. O imunoblot vem sendo aplicado no diagnóstico da hidatidose humana (MADDISON *et al.*, 1989; PINEL, 1989; LARRALDE *et al.*, 1989; SIRACUSANO *et al.*, 1991). Este teste associa a alta resolução dos vários componentes antigênicos por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS com a alta sensibilidade da reação antígeno-anticorpo que pode detectar picogramas de anticorpos (MADDISON *et al.*, 1989). A sensibilidade do imunoblot para o diagnóstico da hidatidose humana é de 90% (MADDISON *et al.*, 1989; SIRACUSANO *et al.*, 1991), enquanto a sua especificidade chega a 100% para o gênero *Echinococcus* (MADDISON *et al.*, 1989). A sensibilidade e especificidade da maioria dos testes variam amplamente, de acordo com a natureza, pureza e qualidade do antígeno, com a natureza das imunoglobulinas (isotipos, etc) ou subpopulações celulares especificadas no teste e com a sensibilidade metodológica da tecnologia selecionada (GOTTSTEIN, 1992).

Desde o desenvolvimento das técnicas imunoenzimáticas heterólogas, diferentes autores vêm estudando a aplicação de imunoenaios enzimáticos para a

hidatidose humana (COLTORTI, 1986). O ELISA realizado em placas de poliestireno com poços múltiplos (micro-ELISA) vem sendo, atualmente, o teste utilizado com mais frequência em estudos epidemiológicos, em virtude de sua alta sensibilidade e utilização de pequenas quantidades de antígeno, bem como pela possibilidade de automação total ou parcial da técnica (COLTORTI, 1986; ROGAN *et al.*, 1991). O ELISA tem apresentado bons resultados utilizando preparações antigênicas brutas de líquido hidático, antígenos parcialmente purificados ou antígenos recombinantes.

1.4. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral caracterizar e comparar a estrutura de genes que codificam duas diferentes subunidades do antígeno B de *E. granulosus*, expressar esses antígenos em *E. coli* e analisar o valor diagnóstico dos peptídeos recombinantes. É também objetivo deste trabalho avaliar o potencial diagnóstico de 4 outros antígenos recombinantes produzidos em nosso laboratório e estabelecer uma comparação entre todos eles.

Sabe-se que um dos maiores problemas que se enfrenta para realização do diagnóstico da hidatidose é a disponibilidade de quantidade suficiente de uma preparação antigênica bem caracterizada para utilização em testes imunodiagnósticos. Mesmo que em alguns casos, antígenos total ou parcialmente purificados tenham aumentado a eficiência dos testes diagnósticos, a pequena quantidade que em geral se obtém a partir de cistos hidáticos acaba por inviabilizar sua utilização. Com o objetivo de solucionar problemas relacionados ao controle de qualidade das preparações antigênicas e da sua produção em grande escala, técnicas de DNA recombinante têm sido amplamente utilizadas.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram os seguintes:

1. Clonar seqüências genômica e de cDNA do antígeno B/1 (AgB8/1) de *E. granulosus* e comparar estas seqüências com aquelas já determinadas para a outra subunidade de baixo peso molecular do antígeno B (AgB8/2).
2. Ampliar a soroteca já disponível no laboratório através de um trabalho conjunto com o LACEN (Laboratório Central do Estado) e posterior

transferência de tecnologia adequada para este órgão estadual através da divulgação dos resultados obtidos;

3. Produzir anticorpos monoclonais contra os antígenos recombinantes;
4. Purificar 6 diferentes antígenos recombinantes expressados em *E. coli*, realizar a avaliação do seu potencial para uso em imunodiagnóstico em ELISA e estabelecer comparações entre eles.
5. Estabelecer comparação entre alguns soros testados com os recombinantes e um peptídeo sintético de 34 aminoácidos disponível, o GU4, que mimetiza a porção C-terminal do antígeno recombinante AgB8/2.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens bacterianas, vetores, enzimas , antibióticos meios de cultura e soluções utilizadas

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas nas transformações com os diferentes plasmídeos foram DH5 α e XL1 (SAMBROOK *et al.*, 1989). Os plasmídeos utilizados como vetores de clonagem foram pBluescript (pBSK-) (Stratagene) e vetores da série pGEX (Pharmacia Biotech).

As enzimas de restrição utilizadas tiveram diferentes procedências, dentre as quais Promega, Gibco, Pharmacia, Amersham, Biolabs e Cenbiot. Os antibióticos utilizados foram ampicilina e tetraciclina, conforme a cepa de *E. coli* cultivada. As soluções dos referidos antibióticos foram preparadas e utilizadas de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989).

Os meios de cultura de bactérias utilizados foram LB, TSB, YT e SOC nas formas líquida, sólida ou semi-sólida. O preparo destes meios de cultura foi feito de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). As soluções foram preparadas segundo SAMBROOK *et al.* (1989), e apresentam-se descritas no Apêndice.

2.2. Cistos hidáticos

Os cistos hidáticos foram obtidos de bovinos procedentes de áreas endêmicas do estado do Rio Grande do Sul, durante abates nos frigoríficos Rost (São Leopoldo) e Líder (Viamão). O líquido hidático era aspirado através de seringa com agulha calibrosa (50x20). Os protoescólices, quando presentes no líquido eram

sedimentados por gravidade, separados do sobrenadante e, quando não imediatamente utilizados, congelados e armazenados a -70°C . O líquido hidático, livre de protoescólices, era centrifugado a 10 krpm por 10 min, a 4°C (centrífuga Sorvall RC5C, rotor SS34) e o sobrenadante era congelado e armazenado a -20°C , até a sua utilização. Os cistos hidáticos eram classificados em férteis ou estéreis pela presença ou não de protoescólices ativos, determinada pela observação em microscópio óptico.

2.3. Preparações antigênicas de líquido hidático

O líquido hidático de cada cisto foi processado separadamente, de acordo com MADDISON *et al.* (1989). O líquido era dialisado contra água bidestilada e liofilizado. O material liofilizado era extraído com 0,01 volume de PBS, por 1 h, à temperatura ambiente, e o extrato era centrifugado a 12 krpm, por 1 h, a 4°C (microcentrífuga Micro Centaur – Sanyo) . Ao sobrenadante era acrescentado um volume de glicerol e a preparação era armazenada a -20°C .

2.4. Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi feita pelo método descrito por BRADFORD (1976). A quantidade de proteína presente em cada amostra analisada era estimada por comparação com uma curva padrão, feita com soluções de BSA com concentrações definidas.

2.5. Soros de pacientes

Os soros humanos utilizados neste trabalho foram coletados dos seguintes grupos de pacientes:

89 soros de pacientes com hidatidose cujo diagnóstico foi confirmado por cirurgia e/ou outros métodos: *western blotting* (nos testes de imunoblot, realizados neste trabalho, para efeito de caracterização dos soros, a detecção de qualquer banda no extrato antigênico parasitário foi considerada como resultado positivo) e/ou ELISA e alguns por DD5 e imunofluorescência; 7 soros de pacientes com hidatidose alveolar (*E. multilocularis*); 36 soros de pacientes com esquistossomose (*Schistosoma mansoni*); 17 soros de pacientes com cisticercose (*Taenia solium*); 17 soros de pacientes com hidatidose policística (*E. vogeli*); 8 soros de pacientes com toxocarose (*Toxocara* spp.) e 37 soros de indivíduos clinicamente normais.

As alíquotas de uso de cada soro eram mantidas em 50% de glicerol, conforme recomendação do Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde, para evitar desnaturação de proteínas devido a congelamento e descongelamento freqüentes.

Antes do uso em ensaios imunológicos com antígenos recombinantes, os soros foram individualmente diluídos em lisado de uma cepa de *E. coli* que carregava o vetor pGEX 4T-1 e incubados por 3 h a temperatura ambiente para a absorção de anticorpos anti-*E. coli* e anti-GST. Experimentos posteriores mostraram que o lisado de *E. coli* pode ser substituído por blotto a 5% sem influência nos resultados, procedimento que foi então adotado por sua maior praticidade para uso rotineiro em diagnóstico.

2.6. Preparação do lisado de *E. coli*

A cepa de *E. coli* carregando o vetor de expressão pGEX 4T-1 foi cultivada em 100 ml de meio LB líquido a 37°C por 14 a 16 horas com agitação (150 rpm). As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 5 Krpm, por 5 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC5C, rotor GSA), e ressuspensas em 10 ml de PBS. A lise das células era feita por sonicação (5 pulsos de 30 segundos à amplitude máxima – sonicador Cole Palmer 4710) em banho de gelo. O lisado foi estocado com 0,02% de azida sódica a -20°C.

2.7. Purificação de ácidos nucleicos

2.7.1. Purificação de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi preparado de diferentes formas, de acordo com sua utilização posterior. Para análise de possíveis recombinantes, o DNA plasmidial foi preparado por diferentes métodos de minipreparação de plasmídeos: lise alcalina e/ou desnaturação por aquecimento (SAMBROOK *et al.*, 1989). Para utilização em reações de seqüenciamento, o DNA de plasmídeo era purificado em grande escala, utilizando-se colunas Qiagen ou colunas Microspin (Pharmacia).

2.7.2. Purificação de fragmentos de DNA

Os fragmentos de DNA utilizados como sonda ou para serem subclonados eram separados por eletroforese em gel de agarose e posteriormente purificados

utilizando-se Sephaglas (Pharmacia), Glassmax (Gibco BRL) ou Nucleon Extraction & Purification (Amersham Life Science), de acordo com as instruções dos fabricantes.

2.7.3. Purificação de RNA de protoescólices

Os protoescólices eram obtidos de cistos hidáticos bovinos e estocados congelados a -80°C . Para a realização da purificação de RNA, era sempre considerada a viabilidade dos protoescólices. Essa análise era feita em microscópio óptico observando-se o padrão de absorção do corante azul de tripano pelos protoescólices mortos. A purificação de RNA só era feita se uma viabilidade superior a 90% fosse constatada. O RNA total de protoescólices era preparado utilizando o reagente Trizol^{RLS} (Gibco BRL-Life Technologies). Cerca de 250 μl de suspensão de protoescólices eram homogeneizados com 750 μl de reagente Trizol. As amostras homogeneizadas eram incubadas por 5 min à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, 250 μl de clorofórmio eram adicionados para cada 750 μl do reagente Trizol utilizado inicialmente. Os tubos eram agitados manualmente por 15 seg e depois incubados à temperatura ambiente por 15 min. As amostras eram centrifugadas a 13 krpm, por 15 min (microcentrífuga Micro Centaur - Sanyo), à temperatura ambiente. A fase aquosa era transferida para outro tubo e o RNA era precipitado misturando-se com 0,7 volumes de álcool isopropílico. As amostras eram incubadas à temperatura ambiente por 10 min e em seguida centrifugadas a 13 krpm. Após a centrifugação, o sobrenadante era removido e o precipitado de RNA era lavado com etanol 75%. As amostras eram misturadas por agitação e centrifugadas a 10 krpm, por 5 min a

temperatura ambiente. Ao final do procedimento, o precipitado de RNA era seco à temperatura ambiente e ressuspenso em água MilliQ contendo 0,1% de DEPC. O rendimento da preparação de RNA e sua qualidade era determinada pelo espectro de absorção entre 220 e 320 nm e a análise eletroforética em gel de agarose. As preparações contendo 1 µg de RNA eram submetidas a um tratamento com 1 µl de DNase I livre de RNase (DNaseI AmpGrade, 1 U/µl, Gibco BRL) em 1 µl de tampão de reação DNase I 10X (Tris-HCl (pH 8,4) 200 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 20 mM) para um volume final de 10 µl por 15 min à temperatura ambiente, para degradação de eventual contaminação de DNA genômico porventura existente no RNA preparado e posteriormente era adicionado 1 µl de EDTA 25 mM e incubadas por 15 min a 65°C para inativação da Dnase I pelo calor e então as preparações eram colocadas em gelo por 1 min. Em seguida as reações eram coletadas por breve centrifugação e as misturas podiam ser usadas diretamente para transcrição reversa.

2.8. RT-PCR

As reações de transcrição reversa seguidas de amplificação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), a partir das preparações de RNA de protoescólices tratadas com DNase I, foram feitas de acordo com o sistema de síntese de primeira fita de cDNA (SuperscriptII Preamplification System, Gibco BRL). A primeira fita de cDNA era sintetizada pela transcriptase reversa SuperscriptII a partir de oligonucleotídeos iniciadores oligo (dT). As condições de reação utilizadas foram aquelas determinadas pelo fabricante.

2.9. Extração de DNA de protoescólices

O DNA foi extraído a partir de protoescólices provenientes de cistos frescos ou armazenados a -80°C , conforme o método descrito por McMANUS *et al.* (1985), com algumas modificações. A um volume de 0,3 ml de protoescólices, contendo cerca de 16000 indivíduos, era adicionado 1 ml de solução de lise (apêndice) e o material era incubado por 2h a 65°C . Seguiam-se extrações com fenol, fenol-clorofórmio e clorofórmio, com centrifugações de 10 krpm, por 5 min a 4°C entre elas. O DNA era precipitado pela adição de NaCl para a concentração final de 100 mM e de dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação a 10 krpm, por 10 min a 4°C , o DNA era lavado com etanol a 70%, seco sob vácuo e ressuspensão em 1 ml de TE (apêndice). Uma nova precipitação era feita, adicionando-se 0,5 volumes de acetato de amônio 7,5 M e dois volumes de etanol absoluto. Após centrifugação, lavagem e secagem em idênticas condições às anteriores, o DNA era ressuspensão em 0,5 ml de TE. A concentração de DNA era medida em espectrofotômetro medindo-se a absorbância a 260 nm, conforme SAMBROOK *et al.* (1989).

2.10. Clonagens

As reações de clivagem foram realizadas em tampão de reação adequado à atividade de cada enzima, conforme recomendado pelo fabricante. As reações de clivagem eram feitas em um volume final de 10 a 20 μl , conforme a quantidade de DNA a ser clivado, utilizando-se 1U de enzima por micrograma de DNA. As reações eram incubadas por 1 h a 37°C e interrompidas por incubação a 65°C , por 15 min.

As reações de ligação eram realizadas utilizando-se proporções molares de vetor/fragmento de 1:4 a 1:8. O volume final das reações era de 10 a 20 μ l e incluía 0,1 volume de tampão de ligação 10X (500 mM Tris-HCl-pH 7,5, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 10 mM ATP, 1 mg/ml albumina de soro bovino (BSA)) e 0,25 U de DNA ligase de T4. As reações eram incubadas a 16°C, por 14 a 16 h ou à temperatura ambiente por 2-4 h ou ainda submetidas a ciclos alternados de temperatura (30 s a 10°C e 30 s a 30°C) em termociclador por 12 a 16 h (LUND *et al.*, 1996).

2.11. Eletro-transformação bacteriana

As células para transformação eram preparadas de acordo com o protocolo descrito por DOWER *et al.* (1988), sendo utilizadas as linhagens bacterianas *E. coli* DH5 α e XL1. Um volume de 40 μ l de células era misturado com 1-2 μ l do DNA (2-10 ng) dissolvido em um tampão de baixa força iônica. O eletroporador GenePulser (R)-BioRad, era ajustado para 2,5 kV de voltagem, 200 Ω de resistência e 25 μ F de capacitância. A mistura de células e DNA era transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm e a descarga de alta voltagem era aplicada. Após a descarga, as células eram imediatamente removidas da cubeta e colocadas em meio de cultura SOC para serem incubadas a 37°C, por 1 h, com agitação. Após isso as células eram semeadas em meio seletivo, com ampicilina. IPTG e Xgal eram adicionados ao meio para concentrações finais de 0,05 mM e 30 μ g/ml, respectivamente. A eficiência de transformação obtida de DNA era de cerca de 10^8 transformantes por micrograma.

2.12. Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram os disponíveis comercialmente e os desenhados especificamente (tabela 2.1).

Tabela 2.1. Oligonucleotídeos utilizados e suas seqüências.

Primer	Seqüência	Procedência
KS	5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'	Stratagene, USA
SK	5'-TCTAGAACTAGTGGATC-3'	Stratagene, USA
Universal	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	Stratagene, USA
Reverso	5'-AACAGCTATGACCATG-3'	Stratagene, USA
AgB8/1F ^a	5'-GCGGATCCGTGGTGGTTACTCAGGCT-3'	Only DNA, USA
AgB8/1R ^b	5'-GCGAATTCGAGCAAATCTATGACTA-3'	Only DNA, USA

^a primer derivado da seqüência AgB8/1 publicada por FROSCHE *et al.* (1994). Este primer contém um adaptador para *Bam*HI para facilitar subseqüentes passos de clonagem.

^b primer derivado da seqüência AgB8/1 publicada por FROSCHE *et al.* (1994). Este primer contém um adaptador para *Eco*RI para facilitar subseqüentes passos de clonagem.

2.13. Marcação de sondas de DNA e hibridização

A marcação de sondas para hibridizações de DNA foram feitas por “random priming” usando-se [α - 32 P] dATP, segundo SAMBROOK *et al.* (1989). Estas sondas foram utilizadas para hibridização com colônias de possíveis clones recombinantes. Os filtros eram pré-hibridizados por 1 h a 65°C em 10 ml de solução de hibridização (apêndice). As sondas (aproximadamente 10^7 cpm) eram desnaturadas a 100°C por 5 min. Adicionava-se a sonda à solução de hibridização e deixava-se hibridizando sob agitação durante 4 h. Posteriormente os filtros eram lavados por 15 min, sucessivamente, em tampão SSC 5X/SDS 0,1%; SSC 2X/SDS 0,1%; SSC 1X/SDS 0,1% e finalmente em SSC 0,2X/SDS 0,1%. Os filtros eram secos à temperatura ambiente e expostos a filmes de raios X por 24 h à temperatura ambiente.

2.14. Condições de amplificação das seqüências de AgB8/1 por PCR

A PCR foi realizada usando-se 20 a 30 ng de DNA, 100 μ M de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 100 ng de cada primer, 1 U de Taq DNA polimerase (Cenbiot), tampão de reação (50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl e 1,5 mM de MgCl₂) num volume total de 50 μ l. A reação de amplificação era realizada em um termociclador PTC-100 Programable Thermal Controler, sob as seguintes condições: 20 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 50°C e 2 min de extensão a 72°C, com um *touch down* de 1°C a cada ciclo, seguido por mais 20 ciclos a uma temperatura de anelamento de 40°C e uma extensão final de 10 min.

2.15. Seqüenciamento de DNA

O seqüenciamento dos segmentos de DNA clonados era feito em ambas as fitas de DNA pelo método de terminação de cadeia com didesoxiribonucleotídeos descrito por SANGER *et al.* (1977), utilizando-se os kits de seqüenciamento T7 Sequencing TM (Pharmacia) ou por *Cycle Sequencing* (DNA Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham).

2.16. Determinação das seqüências genômicas (AgB8/1 e AgB8/2) do antígeno B

A clonagem e seqüenciamento de 390 pb da seqüência genômica do AgB8/2 haviam sido previamente descritas por FERNÁNDEZ *et al.* (1996).

O fragmento genômico de 351 pb do AgB8/1 foi amplificado por PCR a partir de DNA total de *E. granulosus* conforme condições já descritas em 2.14. Os protoescólices foram obtidos de cistos bovinos e o DNA foi preparado de acordo com McMANUS *et al.* (1985). O produto amplificado foi purificado de gel, clonado em vetor pBSK- (Stratagene) e seqüenciado conforme já descrito nas seções anteriores de materias e métodos. As seqüências de nucleotídeos obtidas de ambos os genes e sua seqüência de aminoácidos deduzida foram comparadas usando programas do pacote GCG versão 9.0 (DEVEREUX *et al.*, 1984).

2.17. Purificação de antígenos recombinantes expressados em *E. coli*

Antígenos expressados como proteínas de fusão com a GST de *Schistosoma japonicum* utilizando vetores da série pGEX e a própria GST foram purificados de acordo com SMITH & JOHNSON (1988). Um volume de 80 ml de uma pré cultura da cepa bacteriana contendo o plasmídeo recombinante, cultivada em YT suplementado com ampicilina a uma concentração final de 50 µg/ml, por 14-16 h, a 37°C e com agitação (150 rpm), era inoculado em 800 ml de YT e incubado, por 1 h a 37°C com agitação. Adicionava-se então IPTG para a concentração final de 0,1 mM e a cultura era incubada por mais 3 h nas mesmas condições. As células eram sedimentadas por centrifugação a 5 krpm, por 5 min a 4°C (centrífuga Sorvall RC5C, rotor GSA), e ressuspensas em 8 ml de PBS (apêndice). A lise das células era feita por sonicação (4 a 6 pulsos de 30 Seg com amplitude máxima – sonicador Cole-Palmer 4710) em banho de gelo e posterior adição de triton X-100 (Sigma) para concentração final de 1%. Após centrifugação a 10 krpm, por 5 min a 4°C (rotor Sorvall SS34), o sedimento era ressuspenso em 8 ml de PBS e uma alíquota de 10µl era coletada para posterior análise por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, para análise das proteínas da fração insolúvel. O sobrenadante (fração solúvel) era misturado a 1,5 ml de resina glutationa-sepharose 4B (Pharmacia) 50% em PBS e agitado suavemente por 30 min, à temperatura ambiente, para a ligação da proteína de fusão à resina, por afinidade da porção GST com a glutationa. A resina era coletada por centrifugação, por 3 min a 1 krpm e lavada por 5 vezes com 50 ml de PBS. A proteína de fusão era clivada com trombina pela adição de 50 U de trombina para cada mililitro de resina utilizado, mais 950 µl de PBS. A reação era incubada à temperatura ambiente por 14-16 h com agitação. Depois a resina era sedimentada

por centrifugação a 1 krpm, por 5 min. O antígeno recombinante purificado permanecia no sobrenadante e posteriormente a proteína era dosada pelo método de Bradford.

2.18. Transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose e ensaio imunoenzimático (*western blot*)

Para realização dos *western blots*, foi utilizada a técnica descrita por TOWBIN *et al.* (1979) com algumas modificações.

A montagem do sistema de transferência em cuba vertical utilizado está descrita em AUSUBEL *et al.* (1989). Depois de separadas por eletrofores em gel de poliacrilamida-SDS (12 a 15%), as proteínas eram transferidas para membranas de nitrocelulose em tampão de transferência (apêndice), a uma voltagem constante de 70V por 1 h. A eficiência da transferência era verificada por coloração da membrana com Ponceau 1X, de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose era lavada em PBS (apêndice) e bloqueada com *blotto* 5% (apêndice), por 1 h, à temperatura ambiente. A membrana era então incubada com o soro diluído, por 1 a 2 h, à temperatura ambiente. Após a incubação, o soro era removido e a membrana lavada por 4 vezes, de 5 min cada uma, em PBS. Em seguida a membrana era incubada por 1 h, à temperatura ambiente com o imunocjugado. Era utilizado como imunocjugado um segundo anticorpo de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase (Gibco-BRL) ou um segundo anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma) sempre diluídos 1:1000.

As reações antígeno-anticorpo eram visualizadas por incubação com uma solução contendo 5 mg de DAB (Sigma) e 150 μ l de H₂O₂ em 30 ml de PBS. As reações de revelação eram interrompidas por lavagem em água bidestilada.

2.19. ELISA

Os testes de ELISA foram realizados essencialmente como descrito por MAYER & WALKER (1987). Placas de microtitulação (Falcon 3912) eram sensibilizadas com 0,4 μ g de antígeno recombinante por poço em um volume de 50 μ l em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) por 14 a 16 h a 4°C. As amostras de soro eram diluídas 1:200 em lisado de *E. coli* ou *blotto* 5% e testadas em duplicata. Controles positivos, negativos, sem antígeno e sem soro eram incluídos em cada placa. Como conjugado era utilizado anticorpo anti-IgG humana (Gibco-BRL) marcado com peroxidase diluído 1:1000. OPD (Sigma)/ H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (apêndice) eram utilizados como substratos na revelação. Após 15 min de revelação, a reação era interrompida pela adição de H₂SO₄ 12,5% e a absorbância era medida, a 492 nm (A_{492}), em leitor de ELISA (BIORAD).

Os testes de ELISA realizados com o peptídeo sintético GU4 (conjugado a BSA) seguiam o mesmo protocolo acima descrito com algumas modificações sugeridas em BARBIERI *et al.* (1998).

2.20. Produção de anticorpos monoclonais contra a proteína recombinante (AgB8/1)

Fêmeas de camundongos BALB/c (6 a 8 semanas de idade) eram injetadas intraperitonealmente com 30 µg de AgB8/1 recombinante emulsificados em adjuvante completo de Freund. Quatro semanas depois os animais recebiam uma dose adicional do antígeno com adjuvante incompleto de Freund. Após duas semanas eles recebiam intraesplenicamente 15 µg da proteína recombinante em PBS. Após três dias as células do baço do camundongo imunizado eram fusionadas com células de mieloma SP2/O de camundongo em fase logarítmica de crescimento de acordo com KÖHLER & MILSTEIN (1975). Sobrenadantes de hibridomas eram analisados pelo método de ELISA para verificar a produção de anticorpos. Hibridomas positivos eram clonados por diluições limitantes. A isotipagem dos anticorpos monoclonais (AcMo) era realizada por meio de um kit para isotipagem de anticorpos monoclonais anti-camundongo (Sigma).

2.21. Anticorpos monoclonais anti-GST e contra antígenos recombinantes

O anticorpo monoclonal anti-GST e os demais anticorpos monoclonais contra antígenos recombinantes purificados utilizados nos ensaios imunológicos deste trabalho foram produzidos por Sandra E. Farias, no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul e eram utilizados numa diluição de 1:1000 em *blotto*.

3. RESULTADOS

3.1. Clonagem e seqüenciamento do fragmento de cDNA do antígeno B/1 de *E. granulosus*

A partir da seqüência publicada por FROSCH *et al.* (1994), foram projetados dois primers que foram utilizados para amplificação de um fragmento de cDNA correspondente ao antígeno AgB8/1 de *E. granulosus*. O produto da amplificação obtido continha 259 pb. (Fig. 3.1).

O produto da amplificação foi submetido a uma reação de clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e o fragmento de 259 pb foi então clonado em vetor de expressão pGEX 4T-1 e expresso em cepa DH5 α de *E. coli* como uma proteína de fusão com GST (Fig. 3.2)

O clone contendo o inserto de cDNA de 259 pb foi seqüenciado e foi verificada uma seqüência idêntica àquela descrita por FROSCH *et al.* (1994).

O fragmento clonado não inclui o códon de iniciação (ATG) que é verificado na posição 8 da região 5' da seqüência publicada por FROSCH *et al.* (1994), porém inclui na região 3' o códon de terminação (TAG) situado na posição 251 da seqüência publicada pelos mesmos autores. Esta seqüência possui portanto, uma ORF de 243 pb. O fragmento clonado também não inclui a região hidrofóbica entre os aminoácidos 1 e 14. Esta região, é seguida por 2 potenciais sinais eucarióticos (QA) de clivagem por peptidase após as posições 14 e 16, indicando que AgB8/1 é uma proteína secretória.

Seqüência de cDNA do AgB8/1

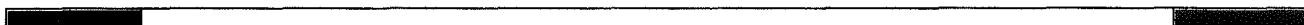
TTTCTGCATGCTTCTCGCTCTGGCTCTCGTCTCATT**CGTGGTGGTTACTCAGGCT**GATGATGGCCTCACCTCGAC
 GTCGAGGAGTGTGATGAAAATGTTTGGCGAAGTGAAGTACTTCTTCGAACGTGATCCGTTGGGTCAGAAAGTGGT
 TGACCTCTTAAAGGAAGTGAAGAAGTGTTCAGTTGTTGAGGAAGAAGCTACGCATGGCACTCAGGTCCCACCT
 CAGAGGGTTGATTGCTGAAGGTGAATAGAGGTGCCAATACACTGTCATGTGACT**TAGTCATAGATTTTGCTCAATA**
 AACCATCTACTTTATCTCTAAAAAAAAAAAA

BamHI


EcoRI

GCG/GATCC

GCG/AATTC



Fragmento AgB8/1 (259 pb)

 Sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI)

*Bam*HI



Primer AgB8/1F: 5'-GCGGATCCGTGGTGGTTACTCAGGCT-3'

*Eco*RI



Primer AgB8/1R: 5'-GCGAATTCGAGCAAAATCTATGACTA-3'

Figura 3.1. Seqüência de cDNA e mapa físico do inserto de cDNA de AgB8/1. As regiões de cDNA em negrito, correspondem às seqüências presentes nos primers AgB8/1F e AgB8/1R.

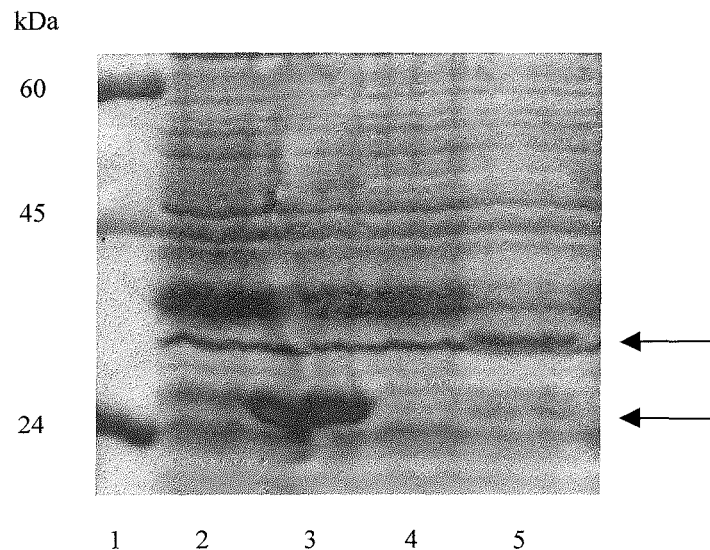


Figura 3.2. Análise eletroforética de extratos protéicos de células de *E. coli* DH5 α portadoras do plasmídeo pGEX-AgB8/1. Os extratos de células portadoras do plasmídeo pGEX4T-1 e do plasmídeo recombinante pGEX4T-1-AgB8/1 foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% e as proteínas foram visualizadas por coloração com *coomassie blue*. (1) marcadores; (2) *E. coli* (pGEX4T-1) sem IPTG; (3) *E. coli* (pGEX4T-1) com IPTG; (4) *E. coli* (pGEX4T-1 – AgB8/1) sem IPTG; (5) *E. coli* (pGEX4T-1 – AgB8/1) com IPTG. As massas moleculares dos marcadores estão indicadas. As setas indicam as posições de GST (canaleta 3) e de GST-AgB8/1 (canaleta 5)

3.2. Clonagem e seqüenciamento do fragmento genômico do AgB8/1 de *E. granulosus*

Os mesmos primers projetados para amplificação do fragmento de cDNA do AgB8/1 (ver em 3.1) foram utilizados para amplificação do fragmento genômico do AgB8/1 de *E. granulosus*. A amplificação por PCR foi realizada nas condições descritas em 2.14, a partir de DNA total de protoescólices de *E. granulosus* e o fragmento obtido possuía 351 pb.

O produto de amplificação foi também submetido a uma reação de clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI o fragmento de 351 pb foi purificado de gel de agarose e clonado em vetor pBSK-.

O clone contendo o inserto genômico de 351 pb foi seqüenciado e foi verificada a presença de um íntron de 92 pb na posição 48 interrompendo o códon 16. O íntron localiza-se entre a seqüência putativa N-terminal hidrofóbica e a seqüência correspondente à proteína secretada.

3.3. Comparação das seqüências genômicas do AgB8/1 e do AgB8/2

Para se obter informações adicionais sobre as similaridades entre os genes que codificam os antígenos AgB8/1 e AgB8/2 realizou-se a comparação entre suas seqüências genômicas usando-se programas do pacote GCG versão 9.0 (DEVEREUX *et al.*, 1984).

A seqüência genômica correspondente ao AgB8/1 possui 351 pb e apresenta um íntron de 92 pb como descrito em 3.2.

A seqüência genômica do AgB8/2 possui 390 pb e apresenta um íntron de 68 pb na posição 60, interrompendo o códon 20 (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996). Este íntron, assim como o da seqüência genômica do AgB8/1, localiza-se entre as seqüências putativas N-terminal hidrofóbica e a seqüência de aminoácidos correspondente à proteína secretada (Fig. 3.3)

As seqüências dos exons determinadas para o AgB8/1 corresponde exatamente à seqüência de cDNA previamente determinada por FROSCH *et al.* (1994) (número de acesso no GenBank Z26336) e a seqüência de cDNA determinada para o AgB8/2 é idêntica àquela previamente descrita por FERNÁNDEZ *et al.* (1996) (número de acesso no GenBank U15001).

A comparação das seqüências de nucleotídeos dos antígenos AgB8/1 e AgB8/2 mostrou identidades de 53,3% nos exons (Fig. 3.3A e 3.3B) e 50% nos íntrons (Fig. 3.3C).

3.4. Confirmação da antigenicidade da proteína de fusão AgB8/1-GST em imunoblot

A antigenicidade da proteína de fusão AgB8/1-GST foi confirmada em imunoblot (Fig. 3.4A) utilizando o soro de um paciente com hidatidose cística confirmada cirurgicamente. Amostras de 2 clones, um não recombinante (contendo apenas o plasmídeo pGEX 4T-1) e um recombinante (contendo o mesmo plasmídeo mais o inserto que codifica o AgB8/1) foram analisados. Como controle foi realizado um imunoblot com as mesmas amostras utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-GST.

A proteína de fusão foi reconhecida pelo soro do paciente com hidatidose (Fig. 3.4A). O produto de degradação da proteína AgB8/1-GST não foi reconhecido pelo soro do paciente. Nenhuma proteína foi detectada pelo soro de um indivíduo normal, utilizado como soro controle negativo (resultado não apresentado).

GST não foi reconhecida pelo soro do paciente com hidatidose cística. A GST do clone não recombinante e a proteína de fusão do clone recombinante mais um produto de degradação de GST foram fortemente reconhecidas por um anticorpo monoclonal anti-GST (Fig 3.4B).

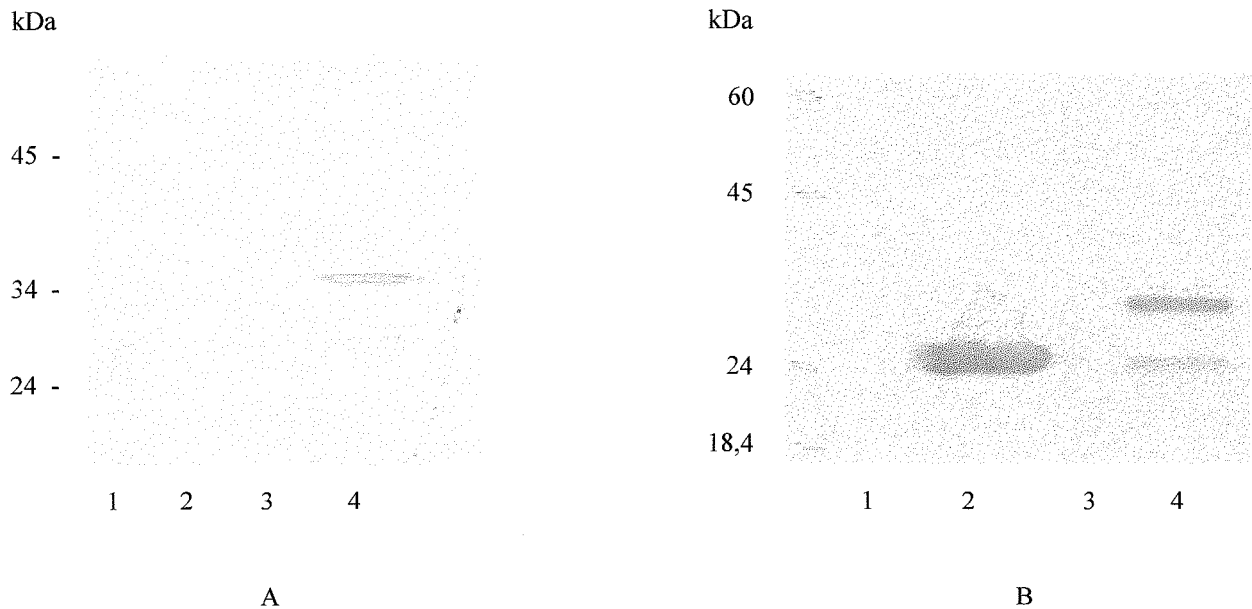


Figura 3.4. Análise em western blot da proteína de fusão AgB8/1-GST. O extrato proteico de *E. coli* DH5 α portadoras do plasmídeo pGEX4T-1 e do plasmídeo recombinante pGEX4T-1-AgB8/1 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% em condições redutoras, e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com o soro de um paciente com hidatidose cirurgicamente confirmada diluído 1:100 (A) ou com anticorpo monoclonal anti-GST diluído 1:500 (B). (1) *E. coli* DH5 α (pGEX4T-1) sem IPTG; (2) *E. coli* DH5 α (pGEX4T-1) com IPTG; (3) *E. coli* DH5 α (pGEX4T-1 – AgB8/1) sem IPTG; (4) *E. coli* DH5 α (pGEX4T-1 – AgB8/1) com IPTG. As massas moleculares dos marcadores estão indicadas.

3.5. Purificação da proteína de fusão AgB8/1-GST produzida em *E. coli*

A proteína de fusão AgB8/1-GST foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando a resina glutationa-sepharose. A purificação foi feita a partir de 880 ml de cultura da cepa portadora do plasmídeo pGEX-AgB8/1, induzida com IPTG por 3 h. O processo de purificação foi monitorado por análise de todas as frações obtidas, por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. A maior parte da proteína de fusão AgB8/1-GST se encontrava na fração solúvel do extrato, a partir da qual foi feita a purificação. A fração solúvel contendo a proteína de fusão era ligada à coluna de afinidade e para obtenção do antígeno recombinante livre da porção de GST, a proteína de fusão era clivada com trombina durante o processo de purificação (ver 2.17). Um rendimento de cerca de 3,5 mg/ml (Fig. 3.5) de antígeno recombinante AgB8/1 podia ser obtido de um volume total de 880 ml de cultura de *E. coli*. Para controle da reação de clivagem da proteína de fusão AgB8/1-GST com trombina, após a conclusão do processo de purificação, era feita a eluição da resina com glutationa reduzida, para liberação da GST e apenas cerca de 10% da proteína não era clivada (dados não mostrados).

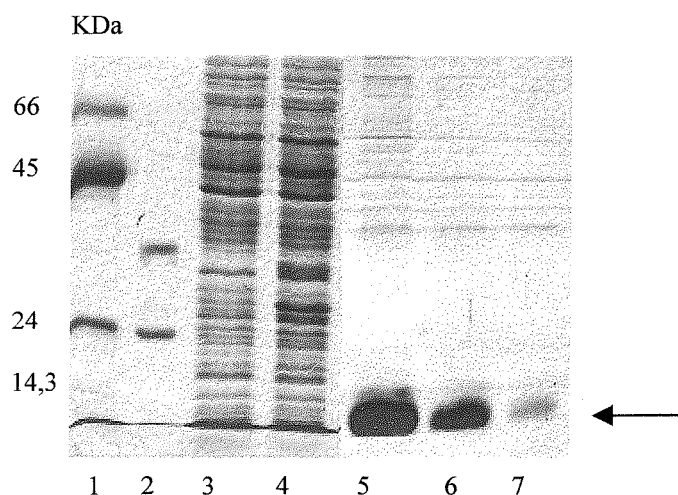


Figura 3.5. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante AgB8/1 por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue* (1) marcadores (2) proteína de fusão AgB8/1+GST + GST (3) extrato total de *E.coli* contendo pGEX4T-1 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/1 sem a indução por IPTG (4) extrato total de *E. coli* contendo pGEX4T-1 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/1 após indução com 0,1 mM de IPTG (5) proteína AgB8/1 purificada (6 μg) – 1^a eluição (6) proteína AgB8/1 purificada (4,5 μg) – 2^a eluição (7) proteína AgB8/1 purificada (1,0 μg) – 3^a eluição. A massa molecular dos marcadores está assinalada. A seta indica a proteína AgB8/1 purificada.

3.6. Expressão das proteínas recombinantes AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8 completa (Ag8c) e Ag8 truncada (Ag8t)

Os clones contendo as seqüências de cDNA, já caracterizadas anteriormente, correspondentes aos antígenos imunogênicos AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8c e Ag8t foram expressados em cepa DH5 α de *E. coli* e as respectivas proteínas de fusão foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando a resina glutationa-sepharose. As purificações foram feitas a partir de 880 ml de cultura da cepa portadora de cada um dos plasmídeos pGEX-AgB8/2, pGEX-Ag4, pGEX-Ag5, pGEX-Ag8c e pGEX-Ag8t, induzidas com IPTG por 3 h. O processo de purificação foi monitorado por análise de todas as frações obtidas, por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS em cada caso. A maior parte das proteínas de fusão se encontrava na fração solúvel do extrato, a partir da qual foi feita a purificação. A fração solúvel contendo cada uma das proteínas de fusão era ligada a uma coluna de afinidade e para obtenção do antígeno recombinante livre da porção de GST, as proteínas de fusão eram clivadas com trombina durante o processo de purificação (ver 2.17). Um rendimento de cerca de 3,5-4,5 mg/ml de antígeno recombinante AgB8/2 podia ser obtido de um volume total de 880 ml de cultura de *E. coli* (Fig. 3.6), enquanto para o Ag4 o rendimento foi de cerca de 0,7 mg/ml (Fig. 3.7), para o Ag5 foi de aproximadamente 0,6 mg/ml (Fig. 3.8), para o Ag8c foi de cerca de 10 mg/ml (Fig. 3.9) e de Ag8t de aproximadamente 2 mg/ml (Fig. 3.10). Para controle da reação de clivagem das proteínas de fusão com trombina, após a conclusão dos processos de purificação, era feita a eluição das resinas com glutationa reduzida, para liberação da GST. Em todos os casos apenas cerca de 10% das proteínas não eram clivadas pela trombina.

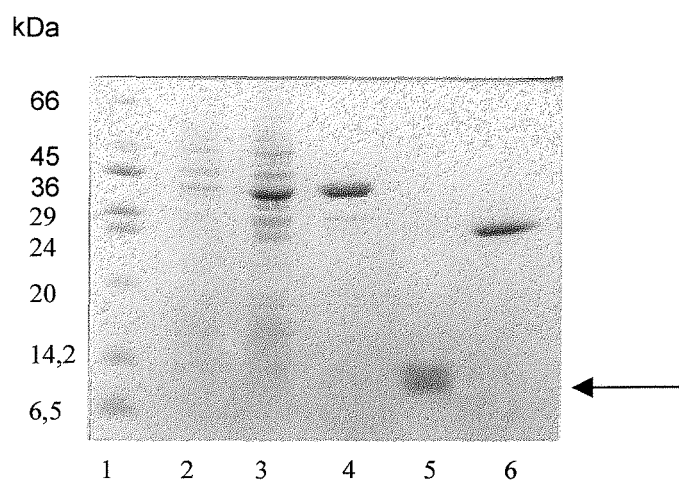


Figura 3.6. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante AgB8/2 por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue*. (1) marcadores (2) extrato total de *E.coli* contendo pGEX4T-2 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/2 sem a indução por IPTG (3) extrato total de *E. coli* contendo pGEX4T-2 com a seqüência de cDNA que codifica o AgB8/1 após indução com 0,1 mM de IPTG (4) proteína de fusão AgB8/2+GST (5) proteína AgB8/2 purificada (4,5 µg) (6) GST (4,0 µg). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína AgB8/2 purificada.

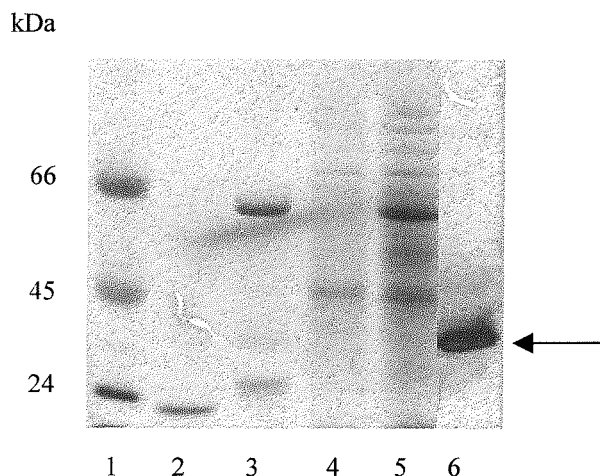


Figura 3.7. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag4 por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue*. (1) marcadores (2) GST (3,0 μg) (3) proteína de fusão Ag4+GST + GST (4) extrato total de *E.coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag4 sem a indução por IPTG (5) extrato total de *E. coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag4 após indução com 0,1 mM de IPTG (6) proteína Ag4 purificada (5,5 μg). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína Ag4 purificada.

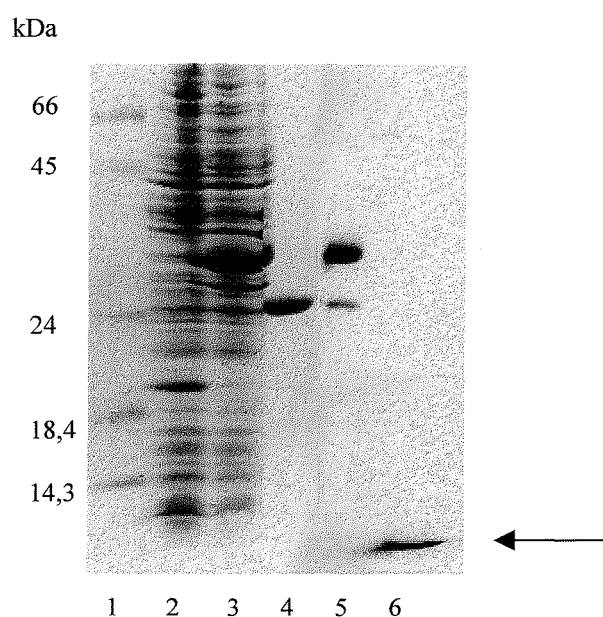


Figura 3.8. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag5 por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue*. (1) marcadores (2) extrato total de *E.coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag5 sem a indução por IPTG (3) extrato total de *E. coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag5 após indução com 0,1 mM de IPTG (4) GST (4,5 μ g) (5) proteína de fusão Ag5+GST + GST (6) proteína Ag5 purificada (3,0 μ g). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína Ag5 purificada.

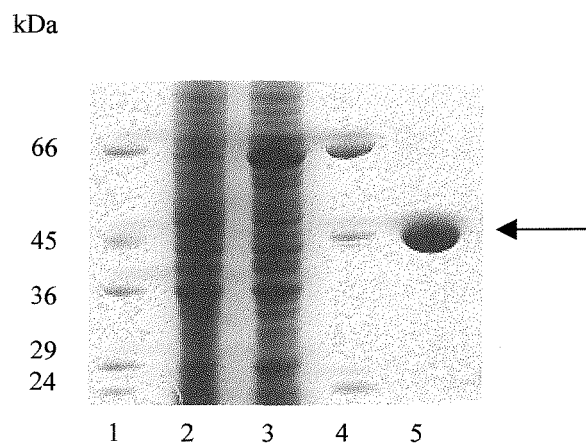


Figura 3.9. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag8c por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue*. (1) marcadores (2) extrato total de *E.coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag8c sem a indução por IPTG (3) extrato total de *E. coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag8c após indução com 0,1 mM de IPTG (4) proteína de fusão Ag8c+GST; Ag8c purificada e GST (5) proteína Ag8c purificada (6,0 µg). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína Ag8c purificada.

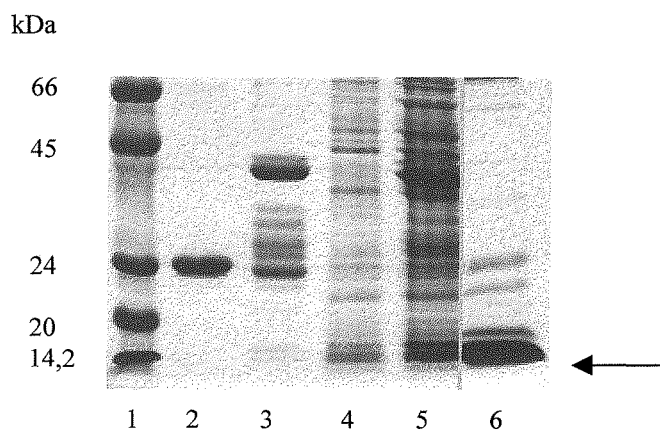


Figura 3.10. Análise de amostras das diferentes etapas de purificação do antígeno recombinante Ag8t por eletroforese em SDS-PAGE. As amostras foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE e coradas com *coomassie blue*. (1) marcadores (2) GST (5,0 μg) (3) proteína de fusão Ag8t+GST + GST (4) extrato total de *E.coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag8t sem a indução por IPTG (5) extrato total de *E. coli* contendo pGEX com a seqüência de cDNA que codifica o Ag8t após indução com 0,1mM de IPTG (6) proteína Ag8t purificada (6,0 μg). As massas moleculares dos marcadores estão assinaladas. A seta indica a proteína Ag8t purificada.

3.7. Obtenção de anticorpo monoclonal contra a proteína recombinante AgB8/1

Os sobrenadantes dos hibridomas obtidos foram analisados por ELISA quando estes encontravam-se em fase logaritmica de crescimento. Os hibridomas positivos foram então clonados por diluições limitantes. A isotipagem do anticorpo monoclonal mostrou que o AcMo α -AgB8/1 obtido era da subclasse IgG1.

Um western blot a partir de um gel SDS-PAGE 12% contendo amostras de líquido hidático e antígeno recombinante AgB8/1 purificado foi realizado para se comprovar a reatividade do AcMo α -AgB8/1 com o antígeno AgB8/1 (Fig. 3.11).

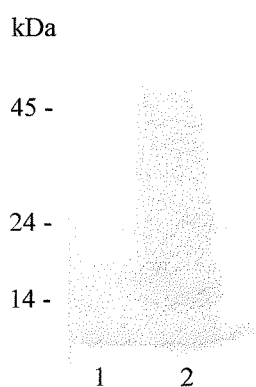
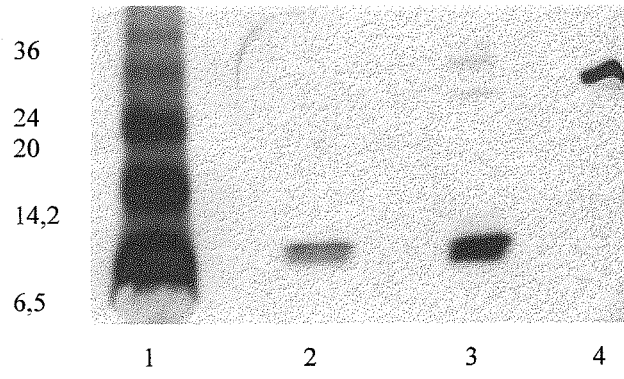


Figura 3.11. Análise em western blot da reatividade do anticorpo monoclonal α -AgB8/1. 5 μ g do antígeno recombinante AgB8/1 purificado e 10 μ g de antígenos de líquido hidático bovino fértil foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12%, em condições redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose. A membrana foi reagida com o AcMo α -AgB8/1 diluído 1:1000 e revelado com imunoglobulina IgG (1:1000) anti-camundongo conjugada com peroxidase. (1) antígeno recombinante AgB8/1; (2) antígenos de líquido hidático. As massas moleculares dos marcadores estão indicadas.

3.8. Caracterização das proteínas recombinantes AgB8/1 e AgB8/2

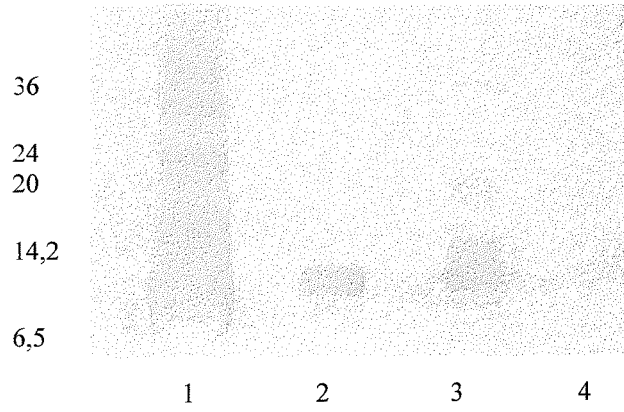
Ambas as proteínas recombinantes AgB8/1 e AgB8/2 purificadas apresentaram um rendimento próximo a 3,5 mg/ml após clivagem com trombina, a partir de 880 ml de cultura de *E. coli* conforme descrito acima. A figura 3.12A, mostra um SDS-PAGE das seguintes proteínas, antígeno B nativo purificado, recombinante AgB8/1, recombinante AgB8/2 e GST. As antigenidades das proteínas recombinantes foram confirmadas por imunoblot com um *pool* de 3 soros de pacientes com hidatidose cirurgicamente confirmada (Fig. 3.12B). Um anticorpo monoclonal contra o recombinante AgB8/1 mostrou que não há reação cruzada com o recombinante AgB8/2, mas reconheceu todas as subunidades do AgB nativo (Fig. 3.12C). Anti-soros de camundongo específicos contra cada recombinante (AgB8/1 e AgB8/2) não mostraram reações cruzadas, embora ambos reconhecessem as subunidades do AgB nativo.

kDa



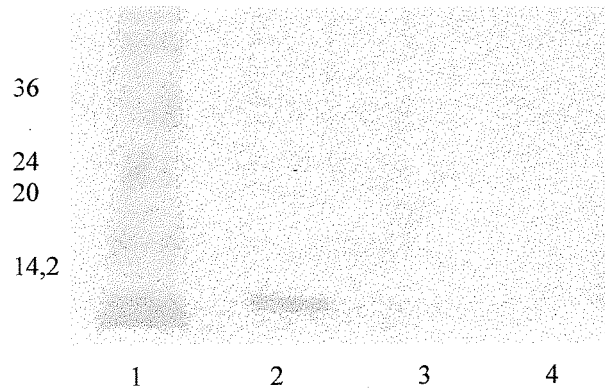
A

kDa



B

kDa



C

Figura 3.12. Antigenicidade das proteínas recombinantes AgB8/1 e AgB8/2.

Antígeno B nativo (6 μg), antígeno recombinante AgB8/1 (3,5 μg), antígeno recombinante AgB8/2 (4,5 μg) e GST (4,0 μg) foram separados por eletroforese em gel 15% de poliacrilamida-SDS em triplicata. Um dos géis foi corado com *coomassie blue* e os outros foram transferidos para membrana de nitrocelulose e reagidos com um *pool* de soros de pacientes com hidatidose (1:200) ou com anticorpo monoclonal anti-AgB8/1 (1:500) e revelados como descrito em materiais e métodos.

A- gel corado com *coomassie blue* B- imunoblot com *pool* de soros C- imunoblot com anticorpo monoclonal anti-AgB8/1 (1) antígeno B nativo; (2) antígeno recombinante AgB8/1; (3) antígeno recombinante AgB8/2; (4) GST

3.9. Padronização dos testes de ELISA usados para avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos recombinantes

Para definição da concentração de antígenos recombinantes a ser utilizada em ELISA, foi feita uma curva de titulação para cada antígeno, reagindo concentrações crescentes dos mesmos com o soro (diluído 1:200) de um paciente com hidatidose confirmada cirurgicamente e com o soro (diluído 1:200) de um indivíduo clinicamente normal (controle negativo). Em todos os casos uma concentração de 0,4 µg/poço de antígeno foi escolhida para a realização dos experimentos. Nesta concentração ocorria uma estabilização na curva de titulação, numa absorvância de 492 nm e não ocorria reação detectável com o soro negativo (dados não mostrados).

3.10. Avaliação do potencial do antígeno recombinante AgB8/1 para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA

O potencial diagnóstico do antígeno recombinante AgB8/1 foi verificado em ELISA anti-IgG frente a soros de pacientes com hidatidose, soros de pacientes com outras parasitoses e soros de indivíduos clinicamente normais utilizados como controles. O valor do *cut-off* foi estabelecido como a média dos 37 soros humanos testados mais dois desvios padrão. Estes resultados estão apresentados na tabela 3.1. Para análise dos resultados foram consideradas 3 situações para os soros de pacientes não confirmados cirurgicamente. Soros de pacientes que possuíam testes de *western blot* e ELISA, utilizando LHBF, positivos, soros que possuíam apenas

western blot positivos e soros que possuíam apenas ELISA positivos, embora outros testes diagnósticos tenham sido realizados em alguns soros (tabela 3.2).

Quando se considerou *western blot* e ELISA positivos, foram detectados 7 soros positivos, para o recombinante AgB8/1, de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente e 26 soros positivos de pacientes com hidatidose porém sem confirmação cirúrgica, totalizando 33 soros positivos para hidatidose de um total de 74 soros com *western* e ELISA, com LHBF, positivos analisados. A sensibilidade calculada neste caso foi de 44,59% (tabela 3.3).

Quando se considerou soros apenas com *western blot* positivos, foram detectados 7 soros positivos, para o recombinante AgB8/1, de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente e 29 soros positivos de pacientes com hidatidose sem confirmação cirúrgica totalizando 36 soros positivos para hidatidose de um total de 85 soros com *western blot*, com LHBF, positivos analisados. A sensibilidade calculada neste caso foi de 42,35% (tabela 3.3).

Finalmente, quando se considerou apenas os soros com ELISA positivos, foram detectados 7 soros positivos, para o recombinante AgB8/1, de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente e 26 soros positivos de pacientes com hidatidose sem confirmação cirúrgica totalizando 33 soros positivos para hidatidose de um total de 78 soros com ELISA, com LHBF, positivos analisados. A sensibilidade calculada neste caso foi de 42,31% (tabela 3.3).

A especificidade do antígeno recombinante AgB8/1 foi de 80,32% (tabela 3.3).

A avaliação do potencial dos demais antígenos recombinantes (AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8t e Ag8c) para utilização no diagnóstico humano da hidatidose por ELISA seguiu os mesmos critérios descritos acima para o antígeno recombinante AgB8/1 e os resultados obtidos estão representados nas tabelas 3.1, 3.2 e 3.3.

3.11. Análise comparativa dos resultados obtidos nos testes de ELISA para os diferentes antígenos recombinantes frente aos soros de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente

Um total de 13 soros de pacientes com hidatidose confirmada por cirurgia foram utilizados neste trabalho.

Testes de ELISA com todos os antígenos recombinantes descritos acima foram realizados frente a estes 13 soros, com os seguintes resultados:

Com o antígeno recombinante AgB8/1 foram detectados 7 soros positivos e 6 negativos, com o recombinante AgB8/2 12 soros foram positivos e 1 negativo, com o recombinante Ag4, 10 soros foram positivos e 3 negativos, com o recombinante Ag5 5 foram positivos e 8 negativos, com o recombinante Ag8t, 4 foram positivos e 9 negativos e finalmente com o recombinante Ag8c 8 foram positivos e 5 negativos.

Comparando-se estes resultados podemos sugerir que o antígeno recombinante AgB8/2 é o que apresenta o melhor potencial para diagnóstico da hidatidose humana, o que pode ser também inferido quando se analisa os dados apresentados na tabela 3.4 que mostram que a sua sensibilidade média é de 86,95% entre as 3 situações consideradas e a especificidade é de 96,72%, seguido pelos antígenos recombinantes Ag4, Ag8c e AgB8/1 que apresentam valores similares de soros positivos de pacientes com hidatidose confirmada por cirurgia bem como sensibilidades também semelhantes. Os recombinantes Ag5 e Ag8t seriam os que apresentam pior performance para utilização no diagnóstico da hidatidose humana, o que pode ser sugerido quando se analisa os valores expressos para esses recombinantes na tabela 3.3 e 3.4 .

3.12. Análise comparativa dos resultados obtidos nos testes de ELISA para os diferentes antígenos recombinantes frente aos soros de pacientes com hidatidose sem confirmação cirúrgica

Um total de 76 soros de pacientes com algum teste positivo (*western blot*, ELISA, DD5, IFI) para hidatidose, porém sem confirmação cirúrgica foram testados com todos os antígenos recombinantes.

64 soros apresentaram resultado positivo para o antígeno recombinante AgB8/1 e/ou AgB8/2 (apenas o soro32 foi positivo para AgB8/1 e negativo para AgB8/2). 6 soros apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos outros antígenos recombinantes, como é o caso do soro 55 (positivo para Ag4 e Ag5) e dos soros 81, 82, 84, 85 e 86 (positivos para Ag8c) (tabela 3.2).

6 soros apresentaram-se negativos para todos os antígenos recombinantes, porém apresentavam resultado positivo para um ou mais testes, como pode-se verificar nos soros 56, 64 e 68 (positivos para *western blot*, ELISA com LHBF e IFI) e os soros 76 (positivo para *western blot* e IFI), 88 (positivo apenas no *western blot*) e 89 (positivo apenas em ELISA com LHBF) (tabela 3.2).

3.13. Resultados dos testes de ELISA com o peptídeo sintético GU4 para avaliação de seu potencial diagnóstico em comparação com o recombinante AgB8/2

A reatividade de alguns soros de pacientes com hidatidose foi analisada frente ao peptídeo sintético GU4, que contém uma seqüência do antígeno AgB8/2. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos para o recombinante

AgB8/2 frente aos mesmos soros. Somente 8 de 20 soros de pacientes com hidatidose testados reconheceram o peptídeo sintético GU4 (tabela 3.1) em comparação com 19 que reconheceram o antígeno recombinante AgB8/2.

Tabela 3.1. Resumo dos resultados obtidos em ELISA usando os antígenos recombinantes AgB8/1, AgB8/2, Ag4, Ag5, Ag8t, Ag8c e o peptídeo sintético GU4

Soros de pacientes testados	Número total de soros	Número de soros positivos*						
		AgB8/1	AgB8/2	Ag4	Ag5	Ag8c	Ag8t	GU4**
Hidatidose cística (confirmada por cirurgia e/ou diagnosticada por I _b -LHBF e/ou E-LHBF)*	89	36	75	38	37	37	24	8
Hidatidose alveolar (<i>Echinococcus multilocularis</i>)	7	5	0	2	2	5	1	
Hidatidose policística (<i>Echinococcus vogeli</i>)	17	5	0	3	6	8	0	
Cisticercose (<i>Taenia solium</i>)	17	0	0	3	4	15	2	
Esquistossomose (<i>Schistosoma mansoni</i>)	36	11	1	6	10	5	3	
Toxocarose (<i>Toxocara</i> spp.)	8	1	1	0	1	8	1	
Indivíduos clinicamente normais	37	2	2	3	4	6	5	

* Dados retirados da Tabela 3.2.

** Vinte soros de pacientes com hidatidose cística foram testados com o peptídeo sintético GU4. Dezenove deles reconheceram também o antígeno recombinante AgB8/2, do qual ele é derivado.

Tabela 3.2. Resultados dos testes de ELISA com os antígenos recombinantes frente a soros de paciente com hidatidose (confirmada cirurgicamente e/ou por outros testes imunológicos). Para comparação, são também apresentados os resultados dos mesmos soros nos outros testes imunodiagnósticos realizados.

Soros	Testes										
	AgB8/1	AgB8/2	Ag4	Ag5	Ag8c	Ag8t	CC	Ib-LHBF	E-LHBF	DD5	IFI
1	-	+	-	-	-	-	+	NT	-	NT	NT
2	+	+	-	-	-	-	+	+	+	NT	NT
3	-	+	+	-	+	-	+	+	-	NT	NT
4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	NT
5	+	+	+	-	+	-	+	-	+	NT	NT
6	-	+	+	-	+	-	+	NT	+	NT	NT
7	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NT	NT
8	-	-	+	+	-	-	+	-	-	NT	NT
9	-	+	+	-	-	-	+	-	-	NT	NT
10	+	+	+	-	+	-	+	+	+	NT	NT
11	+	+	+	+	+	+	+	NT	+	NT	NT
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT
13	-	+	+	-	+	+	+	NT	+	NT	NT
14	-	+	-	+	+	+	ND	+	+	+	NT
15	-	+	-	-	-	+	ND	+	+	+	NT
16	+	+	-	-	-	-	ND	+	+	+	NT
17	-	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	NT
18	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
19	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
20	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	NT
21	-	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
22	-	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
23	-	+	+	-	-	-	ND	+	+	+	NT
24	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	NT
25	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
26	+	+	+	-	-	+	ND	+	+	+	NT
27	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	NT
28	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	-	NT
29	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	-	NT
30	-	+	-	-	-	-	ND	+	+	-	NT
31	-	+	-	-	-	-	ND	+	-	-	NT
32	+	-	-	+	-	+	ND	+	-	+	NT
33	+	+	-	+	-	+	ND	+	+	+	NT
34	+	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	NT
35	+	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	NT
36	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	NT
37	+	+	-	-	+	+	ND	+	+	+	NT
38	-	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	NT
39	+	+	+	-	+	-	ND	+	+	+	NT
40	-	+	-	+	-	-	ND	+	-	-	NT
41	-	+	+	-	-	+	ND	+	+	-	NT
42	+	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	NT
43	-	+	+	-	-	+	ND	+	+	+	NT
44	-	+	+	+	+	-	ND	+	+	+	+
45	-	+	+	+	-	-	ND	+	+	+	+
46	-	+	+	+	-	-	ND	+	+	NT	+
47	+	+	+	+	+	-	ND	+	+	NT	+
48	+	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
49	-	+	+	-	+	-	ND	+	+	NT	+
50	-	+	-	+	-	-	ND	+	+	NT	NT
51	-	+	+	+	-	-	ND	+	+	NT	+
52	-	+	+	+	-	-	ND	+	+	NT	+

53	+	+	+	+	-	-	ND	+	+	NT	+
54	+	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
55	-	-	+	+	-	-	ND	+	+	NT	+
56	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
57	-	+	-	+	-	-	ND	+	+	NT	+
58	-	+	-	+	-	-	ND	+	+	NT	+
59	-	+	+	+	+	-	ND	+	+	NT	+
60	-	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
61	-	+	-	+	-	-	ND	+	-	NT	NT
62	-	+	-	-	-	-	ND	+	-	NT	NT
63	-	+	+	-	-	-	ND	+	+	NT	NT
64	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
65	-	+	-	-	-	-	ND	+	-	NT	+
66	+	+	-	+	-	-	ND	+	+	NT	NT
67	-	+	+	+	+	-	ND	+	+	NT	NT
68	-	-	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
69	-	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
70	-	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
71	+	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
72	-	+	-	-	-	-	ND	+	+	NT	+
73	-	+	-	+	-	-	ND	+	-	NT	+
74	+	+	-	+	-	-	ND	+	-	NT	+
75	+	+	+	+	+	-	ND	+	-	NT	+
76	-	-	-	-	-	-	ND	+	-	NT	+
77	-	+	-	+	+	-	ND	+	+	+	NT
78	+	+	-	+	-	-	ND	+	+	+	NT
79	-	+	-	-	+	-	ND	-	+	-	NT
80	+	+	-	-	+	-	ND	+	+	NT	NT
81	-	-	-	-	+	-	ND	+	+	-	NT
82	-	-	-	-	+	-	ND	-	+	-	NT
83	-	+	-	-	+	-	ND	+	+	-	NT
84	-	-	-	-	+	-	ND	+	+	-	NT
85	-	-	-	-	+	-	ND	+	+	-	NT
86	-	-	-	-	+	-	ND	-	+	-	NT
87	+	+	-	-	+	-	ND	+	+	-	NT
88	-	-	-	-	-	-	ND	+	-	-	NT
89	-	-	-	-	-	-	ND	-	+	-	NT

AgB8/1: antígeno recombinante AgB8/1; AgB8/2: antígeno recombinante AgB8/2;
 Ag4: antígeno recombinante Ag4; Ag5: antígeno recombinante Ag5; Ag8c: antígeno
 recombinante Ag8c; Ag8t: antígeno recombinante Ag8t; CC: confirmação cirúrgica;
 LHBF: extrato de líquido hidático bovino fértil; Ib (LHBF): imunoblot com LHBF;
 ELISA (LHBF): ELISA com LHBF; DD5: dupla difusão em agar para detecção do
 arco 5; IFI: imunofluorescência indireta; NT: não testado; ND: dados não disponíveis.
 Os dados dos testes de DD5 e IFI foram obtidos pela equipe do LACEN (testes já
 dentro da rotina de diagnóstico da hidatidose na Instituição

Tabela 3.3. . Resumo da avaliação do potencial dos antígenos recombinantes testados para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA.

Antígeno recombinante	Grupos de soros homólogos analisados*		
	Ib-LHBF + e E-LHBF + (n = 74)	Ib-LHBF + (n = 85)	E-LHBF + (n = 78)
AgB8/1	Total de soros +: 33 (7 c.c e 26 s/ c.c) Sensibilidade; 44,59% Especificidade:80,32%**	Total de soros +: 36 (7 c.c e 29 s/ c.c) Sensibilidade; 42,35% Especificidade:80,32%**	Total de soros +: 33 (7 c.c e 26 s/ c.c) Sensibilidade; 42,31% Especificidade: 80,32%**
AgB8/2	Total de soros +: 66 (12 c.c e 54 s/ c.c) Sensibilidade; 89,18% Especificidade: 96,72%**	Total de soros +: 74 (12 c.c e 62 s/ c.c) Sensibilidade; 87,05% Especificidade: 96,72%**	Total de soros +: 66 (12 c.c e 54 s/ c.c) Sensibilidade; 84,61% Especificidade: 96,72%**
Ag4	Total de soros +: 37 (10 c.c e 27 s/ c.c) Sensibilidade; 50% Especificidade: 86,07%**	Total de soros +: 38 (10 c.c e 28 s/ c.c) Sensibilidade; 44,7% Especificidade: 86,07%**	Total de soros +: 37 (10 c.c e 27 s/ c.c) Sensibilidade; 47,43% Especificidade: 86,07%**
Ag5	Total de soros +: 31 (5 c.c e 26 s/ c.c) Sensibilidade; 41,89% Especificidade: 77,87%**	Total de soros +: 37 (5 c.c e 32 s/ c.c) Sensibilidade; 43,53% Especificidade: 77,87%**	Total de soros +: 31 (5 c.c e 26 s/ c.c) Sensibilidade; 39,74% Especificidade: 77,87%**
Ag8t	Total de soros +: 23 (4 c.c e 19 s/ c.c) Sensibilidade; 31,08% Especificidade: 90,17%**	Total de soros +: 24 (4 c.c e 20 s/ c.c) Sensibilidade; 28,24% Especificidade: 90,17%**	Total de soros +: 23 (4 c.c e 19 s/ c.c) Sensibilidade; 29,49% Especificidade: 90,17%**
Ag8c	Total de soros +: 33 (8 c.c e 25 s/ c.c) Sensibilidade; 44,59% Especificidade: 61,48%**	Total de soros +: 34 (8 c.c e 26 s/ c.c) Sensibilidade; 40% Especificidade: 61,48%**	Total de soros +: 35 (8 c.c e 27 s/ c.c) Sensibilidade; 44,87% Especificidade: 61,48%**

Ib-LHBF: Imunoblot com extrato bruto de líquido hidático bovino fértil; E-LHBF: ELISA com com extrato bruto de líquido hidático bovino fértil; c.c: soros de pacientes com hidatidose confirmada cirurgicamente; s/ c.c: soros de pacientes com hidatidose sem confirmação cirúrgica.

* Os grupos de soros foram definidos pela positividade em Ib-LHBF e/ou E-LHBF.

** Os dados de especificidade se referem aos resultados obtidos com o conjunto de 85 soros heterólogos discriminados na Tabela 2.

Tabela 3.4. Resumo da avaliação do potencial dos antígenos recombinantes testados para utilização no diagnóstico da hidatidose humana por ELISA, mostrando valores médios de sensibilidade e especificidade.

Antígeno recombinante	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
AgB8/1	43,10	80,32
AgB8/2	86,95	96,72
Ag4	47,38	86,07
Ag5	41,72	77,87
Ag8t	29,60	90,17
Ag8c	43,15	61,48

4. DISCUSSÃO

O antígeno B é uma lipoproteína polimérica e está presente em grande quantidade no líquido hidático do estágio metacestóide de *E. granulosus*. Este líquido é constituído por uma complexa mistura de proteínas derivadas do soro do hospedeiro e produtos de excreção e secreção do parasito (LIGHTOWLERS & GOTTSTEIN, 1995). O alto conteúdo do antígeno B neste fluido pode contribuir para um importante papel deste antígeno na biologia do parasito e, particularmente, em sua relação com o hospedeiro (GONZÁLEZ *et al.*, 1996). Estudos sobre o antígeno B têm sido dirigidos especialmente para a sua relevância no diagnóstico da hidatidose (revisado por GOTTSTEIN, 1992). Este antígeno é altamente imunogênico em infecções humanas e seu valor diagnóstico tem sido reconhecido desde as primeiras análises dos diferentes componentes do líquido hidático (GONZÁLEZ *et al.*, 1996).

Em SDS-PAGE, o antígeno B pode ser dissociado em pelo menos 6 moléculas que diferem em massa molecular por 8 kDa, (LIGHTOWLERS *et al.*, 1989). Os mesmos autores têm proposto que as moléculas maiores poderiam ser polímeros de um monômero de 8 kDa. Duas diferentes subunidades de 8 kDa do antígeno B (denominadas EgAgB8/1 e EgAgB8/2) foram clonadas e caracterizadas até o presente momento (SHEPHERD *et al.*, 1991; FROSCH *et al.*, 1994; FERNÁNDEZ *et al.*, 1996; GONZÁLEZ *et al.*, 1996), apresentando 44% de identidade ao nível de aminoácidos entre elas. A massa molecular calculada para as formas secretadas do EgAgB8/1 e do EgAgB8/2 são 7,5 e 8,2 kDa, respectivamente e há evidências de que estas subunidades poderiam ser os blocos para construção das subunidades maiores, ou seja, elas estariam envolvidas na organização

oligomérica do antígeno B nativo de *E. granulosus* (GONZÁLEZ *et al.*, 1996). De modo a entender as relações entre estas duas proteínas, no presente trabalho foram analisadas a estrutura dos genes que codificam os antígenos AgB8/1 e AgB8/2, expressadas as proteínas correspondentes em *E. coli* e determinados os potenciais diagnósticos para hidatidose dos 2 polipeptídeos recombinantes em comparação com os antígenos de líquido hidático e com outros antígenos recombinantes caracterizados em nosso laboratório, usando um painel de soros humanos com infecções clinicamente definidas e a técnica de micro-ELISA.

Com o objetivo de analisar as relações entre os antígenos AgB8/1 e AgB8/2 suas seqüências genômicas foram comparadas. Ambas as seqüências são interrompidas por íntrons localizados entre a porção N-terminal hidrofóbica putativa (peptídeo sinal) e a porção que codifica a região secretada da proteína. A seqüência genômica do antígeno AgB8/1 apresenta um íntron de 92 pb na posição correspondente ao aminoácido 16 e a seqüência genômica do AgB8/2 apresenta um íntron de 68 pb na posição correspondente ao aminoácido 20. As seqüências dos exons determinadas para o AgB8/1 corresponde exatamente à seqüência de cDNA previamente determinada por FROSCH *et al.* (1994) (número de acesso no GenBank Z26336) e a seqüência de cDNA determinada para o AgB8/2 é idêntica àquela previamente descrita por FERNÁNDEZ *et al.* (1996) (número de acesso no GenBank U15001).

A comparação das seqüências de nucleotídeos dos antígenos AgB8/1 e AgB8/2 mostrou identidades de 53,3% nos exons e 50% nos íntrons.

Considerando as diferenças observadas entre os antígenos AgB8/1 e AgB8/2, foi muito importante avaliar seus potenciais diagnósticos para hidatidose e compará-los com outros antígenos recombinantes, bem como com antígenos de líquido

hidático bovino fértil, atualmente utilizado para diagnóstico de hidatidose por ELISA. Nossos resultados mostraram significantes diferenças nos valores diagnósticos dos diferentes antígenos recombinantes testados. O antígeno recombinante AgB8/2 apresentou a melhor performance em ELISA, mostrando uma sensibilidade média de 86,95% e uma especificidade de 96,72%. A especificidade mais baixa do AgB8/1 (80,32%) sugere que esta subunidade poderia ser responsável pela menor especificidade da preparação de antígeno B nativo (81,9%) (ROTT *et al.*, 2000), quando comparada ao recombinante AgB8/2. Sabe-se que ambos os antígenos (AgB8/1 e AgB8/2) estão presentes em protoescólices (GONZÁLEZ *et al.*, 1996), mas o nível de expressão relativa de cada um permanece ainda desconhecido. Também não se conhece ainda, que proporção de cada subunidade está representada dentro dos polímeros do antígeno B. A possível ocorrência de subunidades adicionais no complexo antígeno B já foi proposta por GONZÁLEZ *et al.* (1996). As diferenças na performance do recombinante AgB8/1 e AgB8/2 em detectar anticorpos no soro de pacientes com hidatidose pode também explicar a variabilidade entre os resultados obtidos por diferentes grupos de pesquisa, os quais têm usado em seus testes diagnósticos antígenos de líquido hidático bruto ou parcialmente purificado de diferentes hospedeiros.

Os resultados derivados de testes do antígeno recombinante AgB8/2 contra soros de pacientes com *E. multilocularis* e *E. vogeli* sugerem que este antígeno pode ser espécie-específico. Não foram observadas reações cruzadas com nenhum dos dois antígenos recombinantes (AgB8/1 e AgB8/2) com soros de pacientes infectados com o cestóide *T. solium*. Testes com maior número de soros homólogos e heterólogos ainda seriam necessários para maior segurança nas conclusões, muito embora, com os resultados já disponíveis é possível sugerir que os antígenos

recombinantes AgB8/1 e AgB8/2 poderiam ser considerados de grande utilidade no diagnóstico da hidatidose cística. Estes dois antígenos permitem ainda a discriminação de algumas reações cruzadas com soros de pacientes com cisticercose, um dos grandes problemas enfrentados no imunodiagnóstico da hidatidose cística (RICKARD & LIGHTOWLERS, 1986). O antígeno recombinante AgB8/2 produz menos reações cruzadas com os soros de pacientes com esquistossomose que o recombinante AgB8/1, fato que é bastante interessante, mesmo quando se considera este achado de menor importância em regiões como o cone Sul da América, onde a esquistossomose não é prevalente (DREYER, 1987, REY, 1991) enquanto a hidatidose cística é endêmica (MATOSSIAN *et al.*, 1977).

Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos para o recombinante AgB8/1 são similares àqueles obtidos por outros grupos usando seqüências similares. LEGGATT & McMANUS (1994) usaram com sucesso o AgB8/1, expressado como uma proteína de fusão com GST sendo capaz de detectar 74% dos casos de hidatidose cística. Reações cruzadas foram observadas em 25% dos soros de pacientes com hidatidose alveolar e em 22% de soros de pacientes com esquistossomose japônica. Não foram observadas reações cruzadas com soros de pacientes com *T. solium*.

McVIE *et al.* (1997) clonaram e expressaram, um fragmento de 165 pb que codifica a porção carboxi-terminal do AgB8/1, como uma proteína de ligação à maltose. O antígeno recombinante mostrou sensibilidade e especificidade para hidatidose cística de 65% e 91% respectivamente, em ELISA, enquanto o antígeno B nativo exibiu 63% de sensibilidade e 81% de especificidade. Neste estudo, o recombinante AgB8/1 mostrou reatividade cruzada com soros de pacientes com hidatidose alveolar, porém não apresentou reatividade com soros de pacientes com

outras infecções helmínticas (esquistossomose, oncocercose e cisticercose) ou de indivíduos clinicamente normais que viviam em regiões endêmicas ou não. Em um estudo feito por LEGGATT & McMANUS (1994), 22% dos soros de pacientes com esquistossomose reagiram com o recombinante AgB8/1, enquanto no nosso estudo 30% apresentaram reação. Em nosso estudo essas reações não podem ser atribuídas à porção de GST uma vez que ela foi removida da proteína recombinante.

Recentemente, BARBIERI *et al.* (1998) testaram 6 antígenos (antígeno bruto HCFA, antígeno B imunopurificado, antígeno 5, peptídeo 65, peptídeo 89-112 e peptídeo GU4) contra uma extensa coleção de soros. O peptídeo 65 é constituído de 26 aminoácidos e mimetiza um epitopo do AgB8/1 (LEGGATT & McMANUS, 1994). O peptídeo 89-122 é derivado do antígeno 5 e foi previamente descrito por CHAMEKH *et al.* (1992). GU4 é um peptídeo sintético de 34 aminoácidos correspondente à porção carboxi-terminal do AgB8/2. Os antígenos 5 e B apresentaram uma maior sensibilidade que os peptídeos deles derivados. Tem sido sugerido que a mais baixa performance diagnóstica dos peptídeos sintéticos em comparação com os antígenos completos pode ser devida à perda de epitopos conformacionais, que ocorrem quando a seqüência de aminoácidos está fora do ambiente promovido pelo restante da molécula protéica (BARBIERI *et al.*, 1998). Os resultados obtidos neste trabalho usando o peptídeo sintético GU4 estão em concordância com os resultados de BARBIERI *et al.* (1998), indicando que a estrutura completa do antígeno é importante para o reconhecimento pelo soro.

Nossos resultados indicam que o antígeno recombinante AgB8/2 apresenta uma excelente performance em detectar anticorpos no soro de pacientes com hidatidose cística. É possível verificar que este antígeno apresenta-se como o de

melhor sensibilidade e especificidade entre os antígenos até hoje individualmente testados de *E. granulosus*.

FERREIRA *et al.* (1996) caracterizaram parcialmente 4 clones recombinantes de uma biblioteca de cDNA que haviam sido isolados pelos mesmos autores usando um pool de soros de pacientes com hidatidose cística (FERREIRA & ZAHA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994).

O clone AgEg4 possuía um cDNA que codificava 332 aminoácidos e mostrava 57,9% de identidade à isoforma citosólica da malato desidrogenase (MDH) de camundongo e suíno (RODRIGUES *et al.*, 1993). A MDH de *E. granulosus* foi expressa em *E. coli* como uma proteína de fusão à GST e demonstrou ser funcional. A presença de epitopos conformacionais em Ag4-GST foi também evidenciada. Verificou-se ainda, que este antígeno possuía uma sensibilidade diagnóstica de 50% em ELISA e poderia discriminar reações cruzadas com soros de pacientes com cisticercose (FERREIRA & ZAHA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994). No presente trabalho, o Ag4 foi expressado como uma proteína de fusão à GST e posteriormente esta porção foi clivada com trombina. O Ag4 purificado foi utilizado para avaliação do potencial diagnóstico para hidatidose cística. Verificou-se uma sensibilidade média de 47,38% e uma especificidade de 86,07%. Ainda, foram observadas reações cruzadas com soros de pacientes com cisticercose, o que não ocorria nos trabalhos anteriores (FERREIRA & ZAHA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994) onde de 9 soros de pacientes com *T. solium* testados nenhum apresentava resultado positivo com Ag4-GST, enquanto no presente trabalho usando-se Ag4 sem a porção de GST, de 17 soros de pacientes com cisticercose testados, 3 foram positivos; no caso de esquistossomose FERREIRA & ZAHA (1994), verificaram que 3 de 9 soros de pacientes com a helmintose testados apresentavam resultado positivo com o

antígeno Ag4-GST, enquanto no presente trabalho utilizando-se Ag4 sem GST obtivemos 6 soros positivos de 36 testados. Portanto no nosso estudo verifica-se reação cruzada em casos de cisticercose, o que poderia ser explicado pelo maior número de soros utilizados neste trabalho, impedindo assim o uso do Ag4 para discriminar reações cruzadas de pacientes com cisticercose como havia sido anteriormente sugerido (FERREIRA & ZAHA, 1994; FERREIRA *et al.*, 1994).

O clone AgEg5 possuía uma seqüência deduzida de 80 aminoácidos contendo 2 motivos *EF-hand* putativos de ligação à cálcio (FERREIRA *et al.*, 1995; CHEMALE, 1995). CHEMALE (1995) verificou que o peptídeo Ag5 possuía uma sensibilidade diagnóstica de 48% e apresentava reações cruzadas com outras helmintoses, ou seja, de 7 soros testados de indivíduos com esquistossomose 1 apresentou resultado positivo com o Ag5 livre de GST, de 17 soros testados de indivíduos com cisticercose 2 foram positivos e de 8 soros de indivíduos com toxocarose 2 foram positivos. No presente trabalho utilizando-se um maior número de soros (média de 79 soros de pacientes com western e/ou ELISA positivos para hidatidose), obteve-se uma sensibilidade média de 41,72% e uma especificidade de 77,87%. Neste trabalho também foram verificadas reações cruzadas com as mesmas helmintoses acima mencionadas, ou seja, de 36 soros testados de indivíduos com esquistossomose 10 apresentaram resultado positivo com o Ag5 livre de GST, de 17 soros testados de indivíduos com cisticercose 4 foram positivos e de 8 soros de indivíduos com toxocarose 1 foi positivo.

O clone AgEg8, isolado por FERREIRA (1993) possuía um cDNA parcial que codificava uma seqüência de 111 aminoácidos revelava um limitado grau de homologia (27-30% de identidade) à proteínas que clivam filamentos de actina, tais como gelsolina, severina e vilina (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995). O

peptídeo de fusão Ag8-GST mostrou uma sensibilidade diagnóstica de 55,5% em ELISA e apresentou algumas reações cruzadas com soros de pacientes portadores de outras helmintoses. O uso do peptídeo Ag4-GST associado ao peptídeo Ag8t-GST elevou a sensibilidade do teste para 66,7% (FERREIRA *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1995). No presente trabalho a proteína parcial Ag8t, foi testada em ELISA, sem a porção de GST e com maior número de soros, e apresentou uma sensibilidade média de 29,6%, portanto inferior àquela já descrita acima. Da mesma forma que nos trabalhos anteriormente citados, aqui, também verificou-se reações cruzadas com outras helmintoses (cisticercose, esquistossomose e toxocaríose).

O cDNA completo do clone AgEg8 obtido mais recentemente, codifica uma seqüência de 370 aminoácidos, liga monômeros de actina e também realiza funções semelhantes a das proteínas da família das proteínas que fragmentam filamentos de actina (HERRERA *et al.*, 1999; HERRERA, 2000 submetido). No presente trabalho foi testado por ELISA o potencial diagnóstico para hidatidose cística deste polipeptídeo completo (Ag8c) sem a porção de GST e foi verificada uma sensibilidade média de 43,15% e uma especificidade de 61,48%, sendo 15 soros positivos dos 17 testados de pacientes com cisticercose, 5 soros positivos de 36 com esquistossomose e 8 soros positivos dos 8 testados de pacientes com toxocaríose.

Para maior segurança nas conclusões do presente trabalho em relação ao uso dos antígenos recombinantes para diagnóstico da hidatidose cística, utilizando o teste de ELISA, dedicou-se uma parte das análises à avaliação dos casos de hidatidose cirurgicamente confirmada, muito embora tem sido mostrado que mais de 25% dos casos de pacientes com hidatidose cística cirurgicamente confirmada não mostram no soro anticorpos anti-HCFA (antígeno de líquido hidático) mesmo quando são usados diferentes testes (WATTRE *et al.*, 1980; ECKERT *et al.*, 1981;

SCHANTZ & GOTTSTEIN, 1986b; BARBIERI *et al.*, 1993, 1994; LIGHTOWLERS & GOTTSTEIN, 1995). Maior incidência de soros falsos negativos têm sido reportadas em pacientes com cistos de pulmão, bem como cistos hialinos intactos (LIGHTOWLERS & GOTTSTEIN, 1995).

Apesar das considerações acima, observando-se os resultados obtidos no presente estudo, verificou-se que o antígeno recombinante AgB8/2, foi também bastante sensível no diagnóstico de pacientes com hidatidose confirmada por cirurgia, onde de 13 soros de pacientes analisados, somente 1 não apresentou anticorpos detectáveis frente a este recombinante.

Os dados indicam, que o antígeno recombinante AgB8/2 poderia se constituir em um discreto antígeno parasitário, capaz de promover uma maior sensibilidade e especificidade no sorodiagnóstico humano da hidatidose cística, podendo, de acordo com nossos resultados, ser considerado espécie-específico. Porém, estudos complementares envolvendo a análise de um maior número de soros homólogos e heterólogos ainda são necessários.

5. CONCLUSÕES

1. As seqüências genômicas do AgB8/1 e do AgB8/2 são interrompidas por íntrons localizados entre a porção terminal hidrofóbica putativa (peptídeo sinal) e a porção que codifica a região secretada da proteína;
2. Entre os antígenos recombinantes analisados o AgB8/2 apresentou uma melhor performance em ELISA para diagnóstico da hidatidose cística;
3. O recombinante AgB8/2 mostrou uma sensibilidade média de 86,95% e uma especificidade de 96,72% em ELISA;
4. A especificidade mais baixa do recombinante AgB8/1 (80,32%) sugere que esta subunidade poderia ser responsável pela menor especificidade da preparação do antígeno B nativo (81,9%) quando comparada ao recombinante (AgB8/2);
5. O antígeno recombinante AgB8/2 pode ser espécie-específico;
6. Os antígenos recombinantes AgB8/1 e AgB8/2 não apresentaram reações cruzadas com soros de pacientes infectados com o cestóide *T. solium*;
7. O antígeno recombinante AgB8/2 produz menos reações cruzadas com soros de pacientes com esquistossomose que o recombinante AgB8/1;

8. O peptídeo sintético GU4 apresentou mais baixa performance diagnóstica em ELISA do que o recombinante AgB8/2 cuja porção C-terminal ele mimetiza;

9. O antígeno recombinante Ag4 não pode ser utilizado para discriminar reações cruzadas de pacientes com cisticercose.

6. PERSPECTIVAS

1. Otimização de técnicas como imunoblot, dot e ELISA com o objetivo de produzir um kit para imunodiagnóstico da hidatidose utilizando os antígenos recombinantes
2. Identificar outros antígenos parasitários espécie-específicos ou utilizar um painel de antígenos recombinantes que possibilitem um diagnóstico mais específico;
3. Caracterizar epitopos antigênicos específicos para utilização em testes diagnósticos;
4. Estabelecer o papel funcional que as proteínas antigênicas identificadas exercem na biologia de *E. granulosus*;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSIN, M. Biochemistry and physiology of *Echinococcus*. *Bulletin of the World Health Organization*, 39: 115-120, 1968.
- AL NAHHAS, S.; GABRION, C.; WALBAUM, S.; PETAVY, A. F. *In vivo* cultivation of *Echinococcus multilocularis* protoscoleces in micropore chambers. *International Journal for Parasitology*, 21: 383-386, 1991.
- AL-YAMAN, F. M. & KNOBLOCH, J. Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37: 101-108, 1989.
- ARAMBULO III, P. Public health importance of cystic echinococcosis in Latin America. *Acta Tropica*, 67, 113-124, 1997.
- AUER, H. Humanmedizinische Aspekte der Toxoplasmose, der Toxocarose und der Echinokokkosen. *Wiener Tierärztliche Monatschrift*, 77: 226-230, 1990.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A. ; STRUHL, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1989.
- BARBIERI, M.; STERLA, S.; BATTISTONI, J.; NIETO, A. High performance latex reagent for hydatid serology using an *Echinococcus granulosus* lipoprotein antigen fraction purified from cyst fluid in one step. *International Journal for Parasitology*, 23: 565-572, 1993.
- BARBIERI, M.; SEVERI, M. A.; PÍREZ, M. I.; BATTISTONI, J.; NIETO, A. use of specific antibody and circulating antigen serum levels in the hydatid

- immunodiagnosis of asymptomatic population. *International Journal for Parasitology*, 24:937-942, 1994.
- BARBIERI, M., FERNÁNDEZ, V., GONZÁLEZ, G., LUACES, V.M.; NIETO, A. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunology*, 20, 51-61, 1998.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, 1976.
- CAPRON, A.; VERNES, A.; BIGUET, J. Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. In: Journées Lyonnaises d'hydatidologie. *Le kyste hydatique du foie*. Lyon, SIMEP, p. 27-40, 1967.
- CHABALGOITY, J. A.; HARRISON, J. A.; ESTEVES, A.; DEMARCO-DE-HORMAECHE, R.; EHRLICH, R.; KHAN, C. M.; HORMAECHE, C. E. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity*, 56: 2402-2412, 1997.
- CHAMEKH, M. GRAS-MASSE, H., BOSSUS, M., FACON, B., DISSOUS, C., TARTAR, A.; CAPRON, A. Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. *Journal of Clinical Investigation*, 89, 458-464, 1992.
- CHEMALE, G. *Caracterização de um antígeno recombinante de Echinococcus granulosus*. Dissertação de Bacharelado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 1995.
- CHEMALE, G. Caracterização de um gene que codifica uma proteína cálcio-ligante

- de *Echinococcus granulosus*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, Porto Alegre, 1998.
- CHORDI, A. & KAGAN, I. E. Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *Journal of Parasitology*, 51:63-71, 1965.
- COLTORI, E. & VARELA-DIAZ, V. M. IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *Journal of Parasitology*, 58:753-756, 1972.
- COLTORI, E. A. Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *American journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35:1000-1005, 1986.
- COLTORTI, E. A. & VARELA-DÍAZ, V. M. Penetration of host IgG molecules into hydatid cysts. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 48: 47-51, 1975.
- COLTORTI, E.; GUARNERA, E.; LARRIEU, E.; SANTILLAN, G.; AQUINO, A. Seroepidemiology of human hydatidosis – use of dried blood samples on filter paper. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 607-610, 1988.
- CRAIG, P. S. & RICKARD, M. D. Studies on the specific immunodiagnosis of larval cestode infections of cattle and sheep using antigens purified by affinity chromatography in an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *International Journal for Parasitology*, 11: 441-449, 1981.
- DAVIES, C.; RICKARD, M. D.; BOUT, D. T.; SMYTH, J. D. Ultrastructural immunocytochemical localization of two hydatid fluid antigens (antigen 5 and antigen B) in the brood capsules and protoscoleces of ovine and equine *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Parasitology*, 77: 143-152, 1978.

- DAVIS, A.; PAWLOWSKI, Z. S.; DIXON, H. Multicentre chemical trials the benzimidazole carbamates in human echinococcosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 64: 383-388, 1986.
- DENHARDT, D. A. A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 23: 641-646, 1966.
- DEVEREUX, J., HAERBERLI, P.; SMITHIES, O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Research*, 12 (1Pt 1), 387-395, 1984.
- DI FELICE, G.; PINI, C.; AFFERNI, C.; VICARI, G. Purification and partial characterisation of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 20:133-142, 1986.
- DI FELICE, G. & SIRACUSANO, A. Monoclonal antibodies for immunodiagnosis of human hydatidosis. *Parasitology Today*, 3(1): 25-26, 1987.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. An efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16: 6127-6145, 1988.
- DREYER, G. Filariasis program-Recife. Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 359-360, 1987.
- ECKERT, J.; GEMMEL, M.; SOULSBY, E. J. L. *FAO/UNDP/WHO Guidelines for surveillance, prevention and control of hydatidosis*. WHO, Geneva, 1981.
- ERSFELD, K. & CRAIG, P. S. Cloning and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* ferritin. *Parasitology Research*, 81: 382-387, 1995.
- ERSFELD, K.; GASSER, R. B.; CRAIG, P. S. The immunodiagnostic potential of

- Echinococcus granulosus* adult-worm antigens in human cystic echinococcosis. *Parasitology Research*, 83: 90-92, 1997.
- ESTEVEZ, A.; DALLAGIOVANNA, B.; EHRLICH, R. A developmentally regulated gene of *Echinococcus granulosus* codes for a 15.6-kilodalton polypeptide related to fatty acid binding proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 215-222, 1993.
- ESTEVEZ, A.; JOSEPH, L.; PAULINO, M.; EHRLICH, R. remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. *International Journal for Parasitology*, 27: 1013-1023, 1997.
- FACON, B.; CHAMEKH, M.; DISSOUS, C.; CAPRON, A. R. Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45:233-240, 1991.
- FELLEISEN, R. B. & GOTTSTEIN, B. Comparative analysis of full-length antigen II/3 from *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus*. *Parasitology*, 109: 223-232, 1994.
- FERNÁNDEZ, V.; FERREIRA, H. B.; FERNÁNDEZ, C.; ZAHA, A.; NIETO, A. Molecular characterisation of a novel 8 Kda subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 77:247-250, 1996.
- FERREIRA, H. B. Antígenos para o imunodiagnóstico da hidatidose humana: caracterização de preparações antigênicas de líquido hidático e clonagem de genes que codificam antígenos de *Echinococcus granulosus*. Porto Alegre, curso de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS, 1993. Tese de doutorado em Genética e Biologia Molecular.

- FERREIRA, H. B. & ZAHA, A. Molecular cloning and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. *International Journal for Parasitology*, 24:863-870, 1994.
- FERREIRA, H. B.; RODRIGUES, J. J. S.; RAUPP, R. M.; ZAHA, A. Molecular cloning and characterization of antigen encoding genes from *Echinococcus granulosus*. In: EHRLICH, R. & NIETO, A. *Biology of parasitism* Ediciones Trilce, Montevideo, 1994.p. 205-216.
- FERREIRA, H. B.; RODRIGUES, J. J. S.; RAUPP, R. M.; FARIAS, S. E.; CHEMALE, G.; ZAHA, A. Molecular cloning and characterization of antigen encoding genes from *Echinococcus granulosus* and their diagnostic value. Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, 12-21 September 1995.
- FERREIRA, H. B.; RODRIGUES, J. J. S. & ZAHA, A. *Echinococcus granulosus* recombinant antigens. *Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science*, 48: 370-376, 1996.
- FRAYHA, G. J. & HADDAD, R. Comparative chemical composition of protoscoleces and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* (Cestoda) *International Journal for Parasitology*, 10: 359-364, 1980.
- FROSCH, P., HARTMANN, M., MÜHLSCHLEGEL, F.; FROSCH, M. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64, 171-175, 1994.
- GEMMEL, M. A. Australasian contributions to an understanding of the epidemiology and control of hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus* – past, present and future. *International Journal for Parasitology*, 20: 431-456, 1990.
- GONZÁLEZ, G., NIETO, A., FERNÁNDEZ, C., ÖRN, A., WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric

- organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunology*, 18, 587-596, 1996.
- GOTTSTEIN, B.; MÜLLER, N.; CRYZ, S. J. J.; VOGEL, M.; TANNER, I.; SEEBECK, T. Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Parasite Immunology*, 12:163-174, 1990.
- GOTTSTEIN, B. Molecular and immunological diagnosis of *Echinococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 5:248-261, 1992.
- GRASS-MASSE, H.; JOLIVET, M.; DROBECQ, H.; AUBERT, J. P.; BEACHEY, E. H.; AUDIBERT, F.; CHEDID, L.; TARTAR, A. Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Molecular Immunology*, 25: 673-678, 1988.
- HAAG, K. L., ARAÚJO, A. M., GOTTSTEIN, B.; ZAHA, A. Selection, recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(5), 695-702, 1998.
- HAAG, K. L.; ARAUJO, A. M.; GOTTSTEIN, B.; SILES-LUCAS, M.; THOMPSON, R. C.; ZAHA, A. Breeding systems in *Echinococcus granulosus* (Cestoda; Taeniidae): selfing or outcrossing? *Parasitology*, 118: 63-71, 1999.
- HEATH, D.D. The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *Taenia serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. *International Journal for Parasitology*, 1: 145-152, 1971.
- HEATH, D. D. & LAWRENCE, S. B. Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. *Parasite Immunology*, 18: 347-357, 1996.

- HELBIG, M.; FROSCH, P. M.; KERN, P., FROSCH, M. Serological differentiation between cystic and alveolar echinococcosis by use of recombinant larval antigens. *Journal Clinical Microbiology*, 31: 3211-3215, 1993.
- HEMMINGS, L. & McMANUS, D. P. The diagnostic value and molecular characterization of an *Echinococcus multilocularis* antigen gene clone. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 53-62, 1991.
- HERRERA, C. E.; RAUPP, R. M.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Cloning, characterization and expression of the EgAg8, an *Echinococcus granulosus* actin-filament fragmenting protein (AFFP). XXVIIIª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBq. 22 - 25 de maio, 1999
- HIRA, P. R.; SHWEIKI, H. M.; SIBOO, R.; BEHBEHANI, K. Counterimmunoelectrophoresis using an arc 5 antigen for the rapid diagnosis of hydatidosis and comparison with the indirect hemagglutination test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36: 592-597, 1987.
- HUGGINS, D.; OLIVEIRA, E. R. IACHINNI, R. OLIVEIRA, M. F. S.; ARRUDA, P. S. C. hepatopatias parasitárias II – helmintíases. *Arquivo Brasileiro de Medicina*, 63:85-96, 1989.
- HUSTEAD, S.T. & WILLIAMS, J. F. Permeability studies on taeniid metacestodes: II. Antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of *Taenia taeniaformis* and *Taenia crassiceps*. *The Journal of Parasitology*, 63: 314-321, 1977.
- ITO, A.; Ma L.; SCHANTZ, P. M.; GOTTSTEIN, B.; LIU, Y. H.; CHAI, J. J.; ABDEL-HAFEZ, S. K.; ALTINTAS, N.; JOSHI, D. D.; LIGHTOWLERS, M. W., PAWLOWSKI, Z. S. Differential serodiagnosis for cystic and alveolar

- echinococcosis using fractions of *Echinococcus granulosus* cyst fluid (antigen B) and *E. multilocularis* protoscolex (EM18). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 188-192, 1999.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L. Antigenic analysis of *Echinococcus* antigens by agar diffusion techniques. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10: 727-734, 1961.
- KAGAN, I. G. A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. *Bulletin of the World Health Organization*, 39: 25-37, 1968.
- KAGAN, I. G. Recent advances in the diagnosis of hydatidosis (1970-1976). *Parasitologia Hungaria*, 11: 31-50, 1978.
- KANWAR, J. R.; KAUSHIK, S. P.; SAWHNEY, I. M. S.; KAMBOJ, M. S.; METHA, S. K.; VINAYAK, V. K. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *Journal of Medical Microbiology*, 36: 46-51, 1992.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495, 1975.
- KROTT, I. U. & RAUSCH, R. L. Characteristics of the protoscolex of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae) as determined by electron microscopy. *Transactions of the American Microscopical Society*, 106: 249-255, 1987.
- KUMARATILAKE, L. M. & THOMPSON, R. C. A. A comparison of *Echinococcus granulosus* from different geographical areas of Australia using secondary cyst development in mice. *International Journal for Parasitology*, 13: 509-515, 1983.
- LARRALDE, C.; MONTOYA, R. M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. A. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera

- from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 282-290, 1989.
- LEGGATT, G. R.; YANG, W.; MCMANNUS, D. P. Serological evaluation of the 12 KDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86:189-192, 1992.
- LEGGATT, G. R. & McMANNUS, D. P. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 KDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid diseases) cyst fluid. *Parasite Immunology*, 16: 87-96, 1994.
- LIGHTOWLERS, M. W.; HARALAMBOUS, M. D.; RICKARD, M. D. Amino acid sequence homology between cyclophilin and a cDNA-cloned antigen of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 287-290, 1989a.
- LIGHTOWLERS, M. W.; LIU, D.; HARALOUMBOUS, A.; RICKARD, M. D. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37:171-182, 1989b.
- LIGHTOWLERS, M.W. AND GOTTSTEIN, B. Echinococcosis / Hydatidosis: Antigens, Immunological and Molecular Diagnosis. In: *Echinococcus* and Hydatid Disease (ed. Thompson, R.C.A & Lymbery, A.J.), pp. 355-410. CAB International, Wallingford, 1995.
- LIGHTOWLERS, M. W.; LAWRENCE, S. B.; GAUCI, C. G.; YOUNG, J.; RALSTON, M. J.; MAAS, D.; HEATH, D. D. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 18: 457-462, 1996.
- LIGHTOWLERS, M. W.; JENSEN, O.; FERNANDEZ, E.; IRIARTE, J. A.; WOOLLARD, D. J.; GAUCI, C. G.; JENKINS, D. J.; HEATH, D. D. Vaccination

- trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology*, 4: 531-534, 1999.
- LUND, A. H.; DUCH, M.; PEDERSEN, F. S. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation. *Nucleic Acids Research*, 24: 800-801, 1996.
- LYMBERY, A. J. & THOMPSON, R. C. A. Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *International Journal for Parasitology*, 18: 803-811, 1988.
- LYMBERY, A. J.; HOBBS, R. P.; THOMPSON, R. C. A. The dispersion of *Echinococcus granulosus* in the intestine of dogs. *The Journal of Parasitology*, 75: 562-570, 1989.
- MADDISON, S. E.; SLEMENDA, S. B.; SCHANTZ, P. M.; FRIED, J. A.; WILSON, M.; TSANG, V. C. W. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 KDa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40:377-383, 1989.
- MARCHIONDO, A. A. & ANDERSEN, F. L. Fine structure and freeze-etch study of the protoscolex tegument of *Echinococcus multilocularis* (Cestoda). *The Journal of Parasitology*, 69: 709-718, 1983.
- MATOSSIAN, R.M., RICKARD, M.D.; SMYTH, J.D. Hydatidosis: a global problem of increasing importance. *Bulletin of the World Health Organization*, 55: 499-507, 1977.
- MAYER, R.J. & WALKER, J.H. *Immunological Methods in Cell and Molecular Biology*. London, Academic Press, 1987. 325 p.
- McMANUS, D.P., KNIGHT, M.; SIMPSON, A.J.G. Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatid organisms, *Echinococcus* spp. (Cestoda). *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16: 251-266, 1985.

- McMANUS, D.P. & SMYTH, J. D. Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitology Today*, 2: 163-167, 1986.
- McVIE, A., ERSFELD, K., ROGAN, M. T.; CRAIG, P.S. Expression and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human echinococcosis. *Acta Tropica*, 67: 19-35, 1997.
- MLIKA, N.; LAROUZE, B.; GAUDEBOUT, C.; BRAHAM, B.; ALLEGUE, M.; DAZZA, M. C.; DRIDI, M.; GHARBI, S.; GAUMER, B.; BCHIR, A.; ROUSSET, J. J.; DELATTRE, M.; JEMMALI, M. Echotomographic and serologic screening for hydatidosis in a Tunisian village. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35 (4): 815-817, 1986.
- MORSETH, D. J. Ultrastructure of developing taeniid embryophores and associated structures. *Experimental Parasitology*, 16: 207-216, 1965.
- MORSETH, D. J. Chemical composition of embryophoric blocks of *Taenia hydatigena*, *Taenia ovis* and *Taenia pisiformis* eggs. *Experimental Parasitology*, 18: 347-354, 1966.
- MÜHLSCHLEGEL, F.; SYGULLA, L.; FROSCH, P. M.; MASSETTI, P.; FROSCH, M. Paramyosin of *echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitology Research*, 79: 660-666, 1993.
- MUSIANI, P.; PIANTELLI, M.; LAURIOLA, L.; ARRU, E.; POZZUOLI, R. *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatidic fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 31: 475-478, 1978.
- ORIOLO, C. & ORIOLO, R. Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24: 569-574, 1975.

- ORIOLO, R.; WILLIAMS, J. F.; PÉREZ-ESANDI, M. V.; ORIOLO, C. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24:96-100, 1971.
- OSSORIO, P. N.; DUBREMETZ, J.; JOINER, K. A soluble secretory protein of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* associates with the parasitophorous vacuole membrane through hydrophobic interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 21: 15350-15357, 1994.
- PAULINO, M.; ESTEVES, A.; VEJA, M. TABARES, G.; EHRLICH, R.; TAPIA, O. Modelling 3D structure for EgDf1 from *Echinococcus granulosus*: putative epitopes, phosphorylation motifs and ligand. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 12: 351-360, 1998.
- PERDOMO, R. Hidatidosis hepática. Diagnóstico temprano en base ecográfica. Experiencia y proyección. *Hidatidosis*, 44: 1-7, 1987.
- PINEL, C.; FRICKER, H.; CHUMPITAZI, B.; GRILLOT, R.; AMBROISE-THOMAS, P. The immunodiagnostic value of six serological techniques in hydatidosis. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Diseases*, 3: 231-240, 1989.
- POOLE, C. B.; GRANDEA, A. G.; MAINA, C. V.; JENKINS, R. E.; SELKIRK, M. E.; McREYNOLDS, L. A. Cloning of a cuticular antigen that contains multiple tandem repeats from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, 89: 5986-5990, 1992.
- POZZUOLI, R., MUSIANI, P., ARRU, E., PIANTELLI, M.; MAZZARELLA, R. *Echinococcus granulosus*: isolation and characterization of sheep hydatid fluid antigens. *Experimental Parasitology*, 32: 45-55, 1972.
- REY, L. (1991). *Parasitología*, 2nd edn. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- RICKARD, M. D.; DAVIES, C.; BOUT, D. T.; SMYTH, J. D. Immunohistological

- localization of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *E. multilocularis* using immunoperoxidase methods. *Journal of Helminthology*, 51: 359-364, 1977.
- RICKARD, M.D. & LIGHTOWLERS, M.W. Immunodiagnosis of hydatid disease. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (ed. Thompson R.C.A.), pp. 217-249. George Allen and Unwin. London, 1986.
- RODRIGUES, J. J. S.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Molecular cloning and characterization of a *Echinococcus granulosus* cDNA encoding malate dehydrogenase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60:157-160, 1993.
- RODRIGUES, J. J. S.; FERREIRA, H. B.; ZAHA, A. Cloning and characterization of a gene encoding a putative Ca²⁺-binding protein from *Echinococcus granulosus*. XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG, 14-17 May, 1994.
- RODRIGUES, J. J. S.; FERREIRA, H. B.; FARIAS, S. E.; ZAHA, A. A protein with a novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237: 451-456, 1997.
- ROGAN, M. T. & RICHARDS, K. S. *Echinococcus granulosus*: changes in the surface ultrastructure during protoscolex formation. *Parasitology*, 94: 359-367, 1987.
- ROGAN, M. T.; CRAIG, P. S.; ZEYHLE, E.; ROMIG, T.; LUBANO, G. M.; DESHAN, L. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field-test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 773-777, 1991.

- ROTT, M. B.; FERNÁNDEZ, V.; FARIAS, S.; CENI, J.; FERREIRA, H. B.; HAAG, K. L.; ZAHA, A. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. *Acta Tropica*, 75: 331-340, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SANCHEZ, A. F. & SANCHEZ, A. Estudio de algunas propiedades físicas y componentes químicos del líquido y pared germinativa de quistes hidáticos de diversas especies y de diferente localización. *Revista Ibérica de Parasitología*, 31:347-366, 1971.
- SANGER, F.; NICKEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 74:5463-5467, 1977.
- SCHANTZ, P. M. Echinococcosis/Hydatidosis (Hydatid Disease) In: GOLDSMITH, R. & HEYNEMAN, D. *Tropical Medicine and Parasitology*. East Norwall, Appleton & Lange, 1989. Cap. 23.6. p. 503-511.
- SCHANTZ, P. M. & GOTTSTEIN, B. Echinococcosis (hydatidosis). In: WALLS, K. F. & SCHANTZ, P. M. (Eds.) *Immunoserology of Parasitic Diseases, Vol I: Helminthic Diseases*. Academic Press, New York, pp. 62-107, 1986a.
- SCHANTZ, P. M. & GOTTSTEIN, B. *Echinococcus* (hydatidosis). In: *Immunologic Investigation of Tropical Parasite Diseases*, WALLS, K. W. & SCHANTZ, P. M., eds., vol. 1, pp. 69-107, Academic Press, Orlando, USA, 1986b.
- SCHANTZ, P. M.; VAN DEN BOSSCHE, H.; ECKERT, J. Chemoterapy for larval echinococcosis in animals and humans: report of a workshop. *Zeitschrift für*

Parasitenkunde, 67: 5-26, 1982.

SCHWABE, C. W. Current status of hydatid disease: a zoonosis of increasing importance. In: *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease* (Edited by THOMPSON, R. C. A.) p. 81-113. George Allen & Unwin, London, 1986.

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

SHEPHERD, J. C.; AITKEN, A.; McMANUS, D. P. a protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44:81-90, 1991.

SIRACUSANO, A.; IOPPOLO, S.; NOTARGIACOMO, S.; ORTONA, E.; RIGANÓ, R.; TEGGI, A.; DE ROSA, F.; VICARI, G. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by immunoblotting. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85:239-243, 1991.

SLAIS, J. & VANEK, M. Tissue reaction to spherical and lobular hydatid cysts of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786). *Folia Parasitologica (Praha)*, 27: 135-143, 1980.

SMITH, D. B. & JOHNSON, K. S. Single-step purification polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67:31-40, 1988.

SMYTH, J. D. *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*: *in vitro* culture of the strobilar stages from protoscoleces. *Angewandte Parasitologie*, 20: 137-147, 1979.

SMYTH, J. D. The insemination- fertilisation problem in cestodes cultured *in vitro*. In Meerovitch, E. (ed.), *Aspects of Parasitology. A Festschrift Dedicated to the*

Fiftieth Anniversary of the Institute of Parasitology of McGill University 1932-1982. McGill University, Montreal, pp. 393-406, 1982.

SMYTH, J. D. & DAVIES, Z. *In vitro* culture of the strobilar stage of *Echinococcus granulosus* (sheep strain): a review of basic problems and results. *International Journal for Parasitology*, 4: 631-644, 1974.

SMYTH, J. D. & SMYTH, M.M. Natural and experimental hosts of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*, with comments on the genetics of speciation in the genus *Echinococcus*. *Parasitology*, 54: 493-514, 1964.

TASSI, C.; DOTTORINI, S.; SCALISE, G.; GERANIO, N. *Echinococcus granulosus*: diagnosis of human hydatid disease by the indirect haemoagglutination reaction with antigens from hydatid fluid and scoleces. *International Journal for Parasitology*, 11: 85-88, 1981.

THOMPSON, R.C.A. (1995). Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: *Echinococcus and Hydatid Disease* (ed. Thompson, R. C. A. & Limbery, A.), pp. 1-50. CAB International, Wallingford.

THOMPSON, R. C. A.; DUNSMORE, J. D.; HAYTON, A. R. *Echinococcus granulosus*: secretory activity of the rostellum of the adult cestode *in situ* in the dog. *Experimental Parasitology*, 48: 144-163, 1979.

THOMPSON, R. C. A. & ECKERT, J. Observations on *Echinococcus multilocularis* in the definitive host. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 69: 335-345, 1983.

THOMPSON, R. C. A. & LYMBERY, A. J. *Echinococcus*: biology and strain variation. *International Journal for Parasitology*, 20: 457-470, 1990.

TODOROV, T.; VUTOVA, K.; MECHKOV, G.; PETKOV, D.; NEDELKOV, G.; TONCHEV, Z. Evaluation of response to chemotherapy of human cystic echinococcosis. *British Journal of Radiology*, 63: 523-531, 1990.

- TOWBIN, H., STACHELIN, T.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA*, 76: 4350-4354, 1979.
- VARELA-DÍAZ, V. M.; COLTORTI, E. A.; RICHARDS, M. I.; GUI SANTES, J. A.; YARZÁBAL, L. A. The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid cyst fluid antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 23: 1092-1096, 1974.
- VON HEIJNE, G. A new method for preceding signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Research*, 14, 4683-4690, 1986.
- WATTRE, P.; CAPRON, M.; DESSAINT, J. P.; CAPRON, A. Apport de l'immunologie au diagnostic et au traitement des maladies parasitaires. *Revue du Practicien*, 30: 969-978, 1980.
- WEN, H.; NEW, R. R. C.; CRAIG, P. S. Diagnosis and treatment of human hydatidosis. *British Journal of Clinic Pharmacology*, 35:565-574, 1993.
- WERCZBERGER, A.; GOLHMAN, J.; WERTHEIM, G.; GUNDERS, A. E.; CHOWERS, I. Disseminated echinococcosis with repeated anaphylatic shock (treated with mebendazole). *Chest*, 76: 482-484, 1979.
- WILLIAMS, J. F. An evaluation of the Casoni test in the human hydatidosis using an antigen solution of low nitrogen concentration. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66: 160-164, 1972.
- YARZÁBAL, L. A.; DUPAS, H.; BOUT, D.; CAPRON, A. *Echinococcus granulosus*: distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage. I. Localization of the specific antigen of hydatid fluid (antigen 5). *Experimental Parasitology*, 40: 391-396, 1976.
- YARZÁBAL, L. A.; DUPAS, H.; BOUT, D.; NAQUIRA, F.; CAPRON, A. *Echinococcus*

granulosus: the distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage.

II. Localizaton of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (antigen B).

Experimental Parasitology, 42: 115-120, 1977.

8. APÊNDICE

Soluções

➤ **Blotto 5% (*bovine lacto transfer technique optimizer*)**

Leite em pó desnatado diluído em PBS para a concentração de 5%.

➤ **Solução de lise de protoescólicas**

Tris-Cl 100 mM (pH 8,0);

NaCl 0,25 M;

EDTA 100 mM;

Proteinase K 100 µg/ml

SDS 0,5%.

➤ **Solução de acetato de sódio 5 M**

Acetato de sódio 3 M;

Ácido acético 2 M;

pH 4,8.

➤ **Tampão de ligação 10X**

Tris-Cl 0,5 M (pH 7,5);

MgCl₂ 100 mM;

DTT 100 mM;

ATP 10 mM;

BSA 1 mg/ml.

➤ **TEB**

Tris-OH 89 mM;

EDTA 2,5 mM;

H₃BO₄ 89 mM;

pH 8,2.

➤ **SSC 20X (solução estoque)**

NaCl 3 M;

Citrato de sódio 0,3 M

➤ **Denhardt 50X (DENHARDT, 1966)**

Ficoll 400000 1%;

Polivinilpirrolidona 1%;

BSA 1%

➤ **Solução de pré-hibridização**

SSC 5X;

Denhardt 5X;

SDS 1%.

➤ **Tampão de lise**

Tris-Cl 100 mM (pH 7,8);

NaCl 150 mM;

MgCl₂ 5 mM;

BSA 1,5 %;

DNase 1 $\mu\text{g/ml}$;

Lisozima 40 $\mu\text{g/ml}$.

➤ **PBS**

Na_2HPO_4 16 mM;

NaH_2PO_4 4 mM;

NaCl 150 mM;

pH 7,3.

➤ **Tampão de transferência**

Tris-Oh 15,6 mM;

Glicina 120 mM;

Metanol 20%;

pH 8,1-8,4.

➤ **Tampão carbonato-bicarbonato**

Na_2CO_3 15mM;

NaHCO_3 35mM;

NaN_3 0,02%;

pH 9,6.

➤ **Tampão citrato-fosfato**

Ácido cítrico 36 mM;

NaHPO_4 83 mM;

pH 5,0.

ANEXO

Trabalho publicado na revista Acta Tropica 75 (2000): 331-340

Comparative Analysis of Two Different Subunits of
Antigen B from Echinococcus granulosus: Gene
Sequences, Expression in Escherichia coli and
Serological Evaluation

**Marilise B. Rott, Verónica Fernández, Sandra Farias, Janine
Ceni, Henrique B. Ferreira, Karen L. Haag & Arnaldo Zaha***

Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation

Marilise B. Rott ^a, Verónica Fernández ^b, Sandra Farias ^c, Janine Ceni ^d,
Henrique B. Ferreira ^d, Karen L. Haag ^e, Arnaldo Zaha ^{d,*}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Cátedra de Immunologia, Facultad de Química, Universidad de la República, Casilla de Correo 1157, Montevideo, Uruguay

^c Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Centro de Biotecnologia and Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15005, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

^e Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15053, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil

Received 25 May 1999; received in revised form 21 January 2000; accepted 7 February 2000

Abstract

Two different *Echinococcus granulosus* antigen B subunits (AgB8/1 and AgB8/2) were characterized and the structure of the genes encoding these two proteins were compared. DNA sequences were expressed in *Escherichia coli* and the antigens' diagnostic value was then assessed. The genomic sequence of AgB8/1 has a 92 bp intron in the position corresponding to amino acid 16; the AgB8/2 genomic sequence presents a 68 bp intron in the position corresponding to amino acid 20. Both introns are located between the putative N-terminal hydrophobic sequence and the secreted peptide. A comparison between the AgB8/1 and AgB8/2 nucleotide sequences showed a 53.5% identity among exons and a 50% identity between introns. According to the molecular diversity analysis, the elapsed time since both genes shared a common ancestor would be around 4.2×10^7 years. When the native AgB and the two recombinant antigens (rAgB8/1 and rAgB8/2) were tested in an anti-IgG ELISA, the sensitivity of the native antigen B was 77.41% and its specificity was 81.9%, while rAgB8/1 showed 54.84% of sensitivity and 80.17% of specificity and rAg138/2 had an 83.87% sensitivity and a 98.28% specificity. Statistical analysis confirms that rAgB8/2 has a better performance than rAgB8/1 and native AgB in ELISA. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Echinococcus granulosus*; Antigen B; Recombinant antigens; Sequence analysis; Serodiagnosis; ELISA

* Corresponding author. Tel.: +55-51-3166086; fax: +55-51-3191079.

E-mail address: zaha@dna.cbiof.ufrgs.br (A. Zaha)

1. Introduction

Cystic hydatid disease (CHD) is a zoonosis caused by infection with the metacestode stage of the tapeworm *Echinococcus granulosus*. The adult worm develops in the small intestine of definitive hosts, mainly dogs and other canids. The metacestode develops mostly in the liver and lungs of intermediate hosts which are primarily ungulates, but can also be man (Thompson, 1995). Identification of discrete parasite antigens that could provide a more sensitive and specific serology has become a relevant research aim (Barbieri et al., 1998). According to Oriol et al. (1971), Oriol and Oriol (1975), and Pozzuoli et al. (1972) attempts to identify hydatid cyst fluid antigens that might be relevant for the immunodiagnosis of hydatid disease led to the biochemical characterization of two major antigens of *E. granulosus*, named antigen 5 and antigen B (AgB). These two lipoproteins are considered to be the most important antigens for the immunodiagnosis of human hydatid disease (Lightowers and Gottstein, 1995).

AgB is an antigenically thermostable lipoprotein of 120–160 kDa (Oriol et al., 1971; Oriol and Oriol, 1975), and Pozzuoli et al. (1972). Piantelli et al. (1977) have shown that AgB consists of at least three components with molecular weights between 10.5 and 20 kDa. The use of monoclonal antibodies against AgB has shown that this antigen is composed of molecules differing in their weight by 8 kDa, suggesting that AgB is a polymer of an 8 kDa subunit (Lightowers et al., 1989). The same authors showed that the relative abundance of AgB subunits decreased asymptotically with the increase of their molecular weight.

Immunoblot detection of the smallest subunit (8 kDa) of AgB provides a good diagnostic tool for CHD (Maddison et al., 1989; Leggatt et al., 1992). Nonetheless, 18% of sera from CHD patients do not react with it, and 39% of sera from alveolar hydatid disease (AHD) patients cross-react with that subunit (Maddison et al., 1989). The smallest subunit of AgB was considered to be *Echinococcus* specific by the same authors.

cDNA sequences encoding an antigen B subunit have been cloned by Shepherd et al. (1991)

and by Frosch et al. (1994). Recently, Fernández et al. (1996) described a novel subunit of AgB (named AgB8/2) showing 40% similarity at the nucleotide level, and 44% at the amino acid level, with the one previously identified, now named AgB8/1. González et al. (1996) showed that both subunits were present in the 8 kDa band observed in SDS-PAGE and that both would constitute building blocks of the bigger subunits. AgB8/1 and AgB8/2 sequences showed a hydrophobic stretch from position 1–16 and 1–20, respectively, followed by one potential eukaryotic peptidase cleavage signal (Von Heijne, 1986). This indicates that both polypeptides (AgB8/1 and AgB8/2) could be secreted proteins.

In this work we have characterized and compared the structure of the genes encoding the two different antigen B subunits. We also expressed both antigens in *Escherichia coli* and assessed the diagnostic value of the recombinant peptides.

2. Materials and methods

2.1. Patients sera

Human sera were collected from the following groups of patients: 31 sera from CHD patients whose diagnosis were confirmed by surgery and/or other methods (DD5, Western blotting and/or ELISA); seven sera from AHD patients (*Echinococcus multilocularis*); 37 sera from schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*) patients; 17 sera from cysticercosis (*Taenia solium*) patients; 18 sera from polycystic hydatid disease (*Echinococcus vogeli*) patients; eight sera from toxocarasis (*Toxocara* spp.) patients; and 29 sera from clinically normal individuals.

Prior to use in the immunological assays with recombinant antigens, individual sera were diluted in an *E. coli* DH5 α strain (carrying pGEX 4T-1 vector) lysate (see below) and incubated for 3 h at room temperature for absorption of anti-*E. coli* and anti-GST antibodies. It was observed that the *E. coli* lysate can be replaced by 5% blotto without influence in the results.

2.2. Preparation of *E. coli* lysate

The *E. coli* strain carrying the pGEX 4T-1 vector was grown in 100 ml of LB liquid medium at 37°C for 14–16 h. Bacteria were recovered by centrifugation, resuspended in 10 ml PBS and lysed by sonication. The lysate was stored with 0.02% sodium azide at –20°C.

2.3. Preparation of native antigen B

The native antigen B was obtained from hydatid cyst fluid by anion exchange chromatography according to the protocol described by González et al. (1996).

2.4. Cloning, expression and purification of recombinant antigens rAgB8/1 and AgB8/2

2.4.1. rAgB8/1

Total RNA was prepared from *E. granulosus protoscoleces* (sheep strain) collected from a bovine hydatid cyst. First strand cDNA was synthesized using superscript reverse transcriptase (Gibco BRL). Total AgB8/1 cDNA produced was used in a polymerase chain reaction (PCR) with the PCR primers AgB8/1 F (5'-GCGGATC-CGTGGTGGTTACTCAGGCT-3') and AgB8/1R (5'-GCGAATTCGAGCAAAATCTATGACTA-3') derived from the published AgB8/1 sequence (Frosch et al., 1994). These primers contained *Bam*HI (AgB8/1F) and *Eco*RI (AgB8/1R) restriction sites to facilitate subsequent cloning steps. PCR was performed with 100 µM of each dNTP, 100 ng of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase (Cenbiot) in a volume of 50 µl. The amplification reaction was carried out in a PTC-100 programmable thermal controller thermocycler under the following conditions: 20 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 50°C and 2 min extension at 72°C, with a touch down of 1°C at every cycle, followed by 20 more cycles at an annealing temperature of 40°C and a final 10 min extension. The 331 bp amplification product was gel purified (Glassmax[®], Gibco BRL), sequenced by the dideoxy chain termination method (Sanger et al., 1977) (Thermo Sequenase, Pharmacia) and cloned into pGEX4T-1

(Pharmacia) for expression in *E. coli* XL 1 blue cells. The recombinant antigen, expressed as a fusion protein with glutathione *S*-transferase (GST), was purified by affinity chromatography according to Smith and Johnson (1988) after induction with 0.1 mM IPTG for 3 h. The GST fusion protein was cleaved by thrombin treatment for a period of 14 h at room temperature using up to 10 cleavage units/mg of fusion protein. Samples from the different purification steps were analysed by SDS-PAGE. Antigen concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

2.4.2. rAgB8/2

The cloning of the cDNA encoding AgB8/2 has been previously described (Fernández et al., 1996). The cDNA sequence encoding AgB8/2 was then subcloned into pGEX4T-2 and expressed in *E. coli* (AD202) as a fusion product with GST. The rAgB8/2 was purified as described above.

2.5. SDS-PAGE and immunoblotting

Proteins were separated on 15% SDS-polyacrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. (1979). Membranes were probed for 1 h at room temperature with a diluted (1:200) pool of three human CHD sera and with a monoclonal antibody anti-rAgB8/1 diluted (1:500). Goat antihuman immunoglobulin (Ig) G (4.75 mg/ml) (Gibco BRL) conjugated to horseradish peroxidase and rabbit anti-mouse immunoglobulin (Ig) G (1.3 mg/ml) (Dako) conjugated to peroxidase, respectively, and diaminobenzidine/H₂O₂ were used to visualize the antigen–antibody reaction. Both conjugates were diluted 1:1000 before use.

2.6. ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed essentially as described by Mayer and Walker (1987). Microtitration plates were coated with 0.4 µg/well of rAgB8/1, rAgB8/2 or native AgB diluted in carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6). The sera samples were diluted 1:200 in an *E. coli* cells lysate and tested in

duplicates. Positive, negative, no antigen, and no serum controls were included in each plate. Goat anti-polyvalent human immunoglobulin (Ig) G conjugated to horseradish peroxidase (HRP), diluted 1:1000, was used as a second antibody and *ortho*-phenylenediamine (OPD), citrate-phosphate buffer and H₂O₂ was used to visualize the antigen–antibody reaction, that was measured at 492 nm (A_{492}). Each considered value of A_{492} represents the mean of two readings that differed no more than 10% from each other. For the interpretation of seropositivity, a threshold value was calculated for each antigen: it corresponded to the mean A_{492} value obtained for all the tested clinically normal human sera plus 2 S.D.s. The results obtained for both recombinants were χ^2 tested to verify the significance of their differences in sensitivity and specificity.

Twenty CHD patient sera were also tested with GU4 synthetic peptide as described by Barbieri et al. (1998)

2.7. Determination of AgB genomic sequences

Cloning and sequencing of the 390 bp AgB8/2 genomic sequence have been previously described by Fernández et al. (1996).

The genomic 351 bp DNA fragment of AgB8/1 was amplified by PCR from *E. granulosus* protoscoleces total DNA under the same conditions described above (see Section 2.4). Protoscoleces were obtained from bovine cysts and DNA was prepared according to McManus et al. (1985). The amplified product was gel-purified (Glassmax, Gibco BRL), cloned into the pBSK-vector (Stratagene) and sequenced.

We also used specific PCR primers to amplify AgB8/1 and AgB8/2 genomic sequences from *E. granulosus* sheep and horse strains and from *E. vogeli*. The nucleotide sequences obtained for both genes and their deduced amino acid sequences were compared using the GCG Wisconsin package (Devereux et al., 1984). Within each strain or species, the divergence between AgB8/1 and AgB8/2 was estimated according the molecular diversity (Nei, 1987), which was represented in terms of the nucleotide (parameter π_N) or amino acid (parameter π_A) diversity. The molecu-

lar diversities and their S.D.s were calculated for each of three gene regions (exon 1, intron and exon 2) and for the whole protein using the DnaSp 2.0 program (Rozas and Rozas, 1997). In order to estimate the divergence time between both genes, we used the average intron nucleotide diversity. For this we used the equation $T = \pi_N / 2\lambda$ (Nei, 1987), where T is the divergence time in million years, π_N is the nucleotide diversity and λ is the average substitution rate in introns.

3. Results

3.1. Comparison of AgB8/1 and AgB8/2 genomic sequences

In order to get additional information about the similarities between the genes encoding these antigens, we have sequenced the 351 bp genomic fragment corresponding to AgB8/1. This sequence presents a 92 bp intron in position 48 interrupting codon 16. The 390 bp AgB8/2 genomic sequence presents a 68 bp intron in position 60 interrupting codon 20 (Fernández et al., 1996). Both introns are located between the putative N-terminal hydrophobic sequences and the amino acid sequence corresponding to the secreted proteins (Fig. 1).

The AgB8/1 determined exon sequences corresponds exactly to the cDNA sequence previously determined by Frosch et al. (1994) (accession number Z26336) and the AgB8/2 cDNA determined sequence is identical to the sequence previously described by Fernández et al. (1996) (accession number U15001).

Comparison of the AgB8/1 and AgB8/2 nucleotide sequences showed identities of 53.3% in exons (Fig. 1A and B) and 50% in introns (Fig. 1C). The molecular diversity analysis resulted in an average π_A of 0.8533 for the deduced protein and averages of $\pi_N = 0.2766$ for the first exon; $\pi_N = 0.3088$ for the intron; and $\pi_N = 0.4560$ for the second exon (Table 1). Considering $1 = 3.7 \times 10^{-9}$ (average substitution rate in introns) (Nei, 1987), the elapsed time since both genes shared a common ancestor would be around 4.2×10^7 years.

3.2. Expression and characterization of AgB8/1 and AgB8/2 recombinant proteins

Both AgB8/1 and AgB8/2 recombinant proteins were expressed in *E. coli* as a fusion with GST and the GST moieties were removed by thrombin treatment. Fig. 2 shows the analysis of AgB8/2 recombinant protein by SDS-PAGE. After thrombin cleavage 3.5 mg/ml of pure rAgB8/2 antigen could be obtained from 880 ml of *E. coli* culture. Similar result was obtained with the recombinant AgB8/1 antigen.

Fig. 3A shows an SDS-PAGE of purified native AgB, rAgB8/1, rAgB8/2 and GST proteins. The antigenicities of the recombinant proteins were confirmed by immunoblotting probed with a pool of three sera from patients with surgically confirmed CHD (Fig. 3B). A monoclonal antibody against rAgB8/1 showed no cross reaction with

rAgB8/2, but recognized all the native AgB subunits (Fig. 3C). Specific mouse antisera against each recombinant protein showed no cross-reactions, even though both sera recognized the native AgB subunits.

3.3. Comparison of native and recombinant AgB in ELISA

The native antigen B and the two recombinant antigens (rAgB8/1 and rAgB8/2) were tested in an anti-IgG ELISA with individual sera from CHD patients, clinically normal individuals and bearers of other helminthic infections. The cut-off values for native and recombinant AgB were established as the mean of all the tested normal human sera plus 2 S.D.s. The results are presented in Table 2.

The sensitivity of native AgB was 77.41% and the specificity was 81.9% as compared to a 54.84%

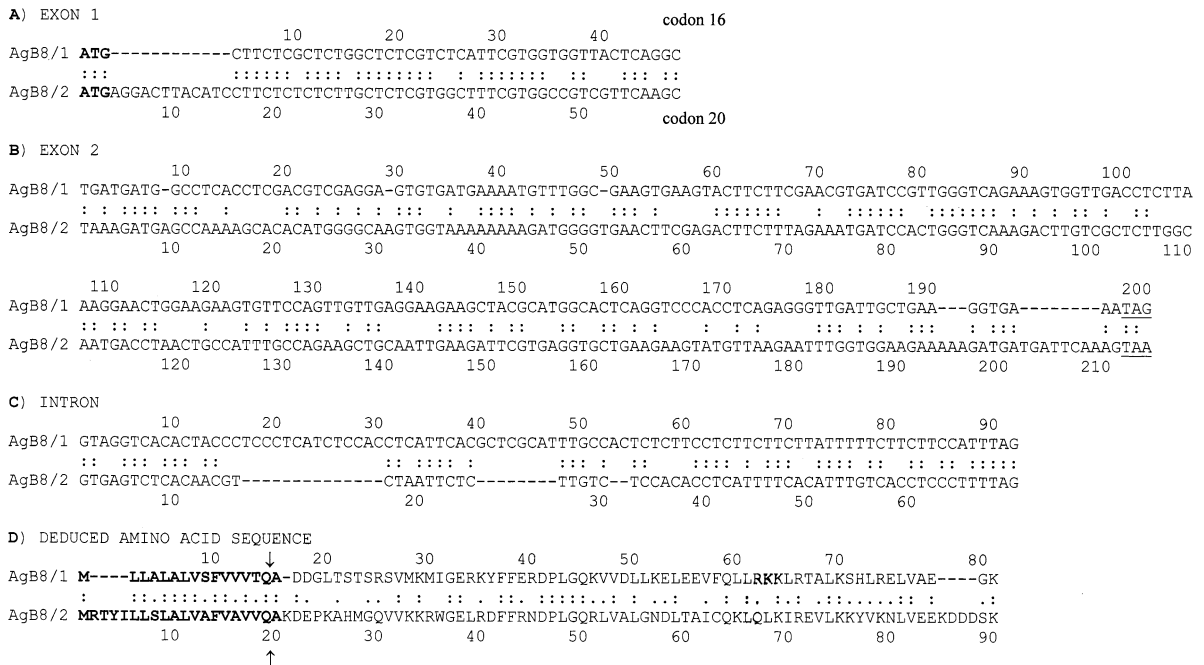


Fig. 1. Comparison between exons, introns and amino acid sequences of AgB8/1 and AgB8/2. In (A) and (B) only the coding portions of the exons are represented. The ATG initiation codons are in bold and the stop codons are underlined. The gaps introduced in the sequences for better alignment are represented by hyphens (-) in both nucleotide and amino acid sequences. Identical nucleotides and amino acids are indicated by a colon (:), and conserved amino acid substitutions are represented by dots (.). The amino acids corresponding to the codons interrupted by introns are indicated by arrows in (D). The GenBank accession numbers for the genomic and cDNA sequences of AgB8/1 are AF 143813 and Z26336, respectively. The GenBank accession numbers for the genomic and cDNA sequences of AgB8/2 are L48620 and U15001, respectively.

Table 1

Nucleotide (π_N) and amino acid (π_A) diversities, their respective S.D.s (in parenthesis) and the estimated divergence time (T) in million years between AgB8/1 and AgB8/2^a

	Nucleotide diversity (π_N)			Amino acid diversity (π_A)	Divergence time (T)
	Exon 1	Intron	Exon 2		
Sheep strain	0.2766 (± 0.1383)	0.3529 (± 0.1765)	0.4774 (± 0.2387)	0.8804 (± 0.1312)	0.048
Horse strain	0.2766 (± 0.1383)	0.3382 (± 0.1691)	0.4472 (± 0.2236)	0.7692 (± 0.1181)	0.046
<i>E. Vogeli</i>	0.2766 (± 0.1383)	0.2353 (± 0.1176)	0.4433 (± 0.2216)	0.9103 (± 0.1346)	0.032
Average	0.2766	0.3088	0.4560	0.8533	0.042

^a For details see Section 2.

sensitivity and an 80.17% specificity of rAgB8/1, and an 83.87% sensitivity and a 98.28% specificity of rAgB8/2. Considering the obtained and the expected numbers for positive and negative sera, we found a $\chi^2 = 8.01$ ($P < 0.01$) for rAgB8/1 and a $\chi^2 = 1.02$ ($P > 0.05$) for rAgB8/2. Additionally, an heterogeneity test between both recombinant antigens resulted in $\chi^2 = 25.09$ ($P < 0.01$). These findings statistically confirm that rAgB8/2 has a better performance than rAgB8/1 and native AgB in ELISA and that this difference is significant.

We have also analysed the reactivity of CHD patient sera to a synthetic peptide (GU4) containing a sequence from AgB8/2 and compared the results with those obtained for rAgB8/2. Only eight out of 20 CHD patient sera recognized the GU4 synthetic peptide in comparison with 19 that recognized the rAgB8/2 (Table 2).

4. Discussion

In SDS-PAGE, antigen B can be dissociated in at least six molecules which differ in MW by 8 kDa, thus ranging from 8 to at least 48 kDa, (Lightowlers et al., 1989). These authors have proposed that the larger molecules might be polymers of an 8 kDa monomer. Two different approximately 8kDa subunits of antigen B (named EgAgB8/1 and EgAgB8/2) have been cloned and characterized so far (Shepherd et al., 1991; Frosch et al., 1994; Fernández et al., 1996; González et

al., 1996), with an overall aminoacid identity of 44% between them. The calculated MW for the secreted forms of EgAgB8/1 and EgAgB8/2 are 7.5 and 8.2 kDa, respectively, and there is evidence that these subunits could be the building blocks of the larger ones (González et al., 1996). In order to understand the relationships between these two proteins, in the present report we have analysed the structure of the genes encoding antigens AgB8/1 and AgB8/2, expressed the corre-

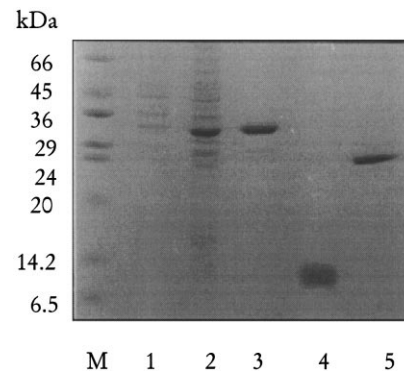


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of recombinant AgB8/2 antigen at different purification steps. The samples were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue: (1) total extract from *E. coli* containing pGMT-2 with the cDNA sequence encoding AgB8/2 without IPTG induction, (2) total extract from *E. coli* containing pGMT-2 with the cDNA sequence encoding AgB8/2 after induction with 0.1 mM of IPM, (3) fusion protein AgB8/2 + GST, (4) purified AgB8/2 protein (4.5 μ g), and (5) GST (4.0 μ g). All molecular weights shown are in kDa.

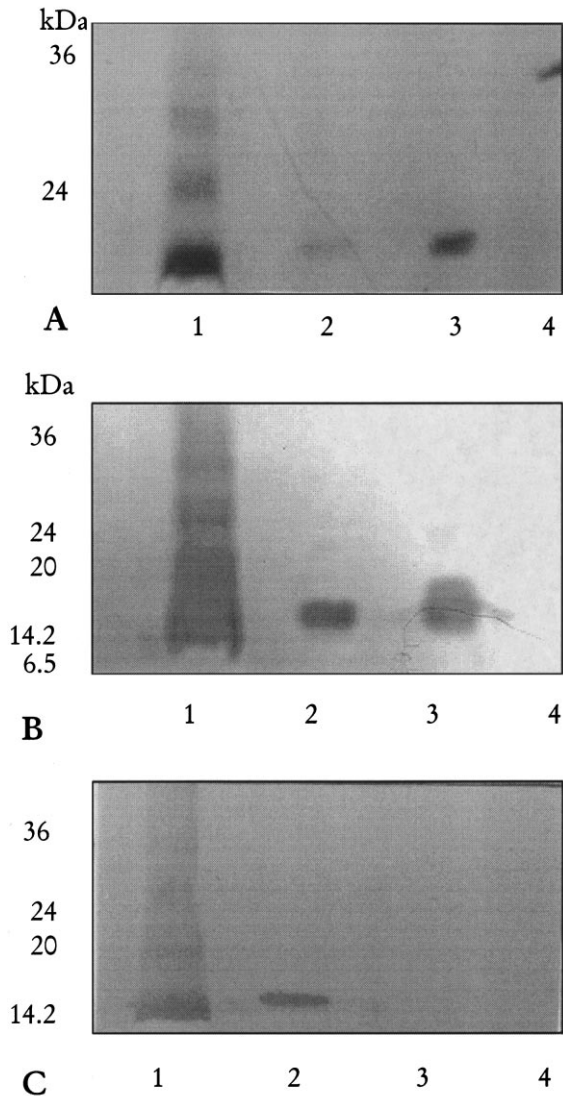


Fig. 3. Antigenicity of the AgB8/1 and AgB8/2 recombinant proteins. Coomassie stained 15% SDS-PAGE gel (A) and immunoblot (B and C) of (1) native antigen B (6 μ g), (2) rAgB8/1 (3.5 μ g), (3) rAgB8/2 (4.5 μ g), and (4) GST (4.0 μ g). The blots were probed with: (B) a pool of three human CHD (1:200) sera developed with an anti-human immunoglobulin IgG (1:500) peroxidase conjugate, (C) a MAb α -rAgB8/1 (1:500) developed with an anti-mouse immunoglobulin IgG (1:1000) peroxidase conjugate.

sponding proteins in *E. coli* and assessed the recombinant peptides diagnostic value for CHD using a panel of clinically defined human infection sera and the microplate ELISA technique.

In order to analyse further relationships between both antigens we have compared their genomic sequences. They are interrupted by introns located between the putative N-terminal hydrophobic signal peptide and the secreted protein coding regions. Based on the nucleotide diversity of the introns, we estimated that the elapsed time since both genes shared a common ancestor would be around 4.2×10^7 years. Two interesting results came out of the molecular diversity analysis, both suggesting an important role for this antigen in host/parasite interactions. First, the nucleotide diversity of the second exon, which codes for the secreted protein, is higher than that of the first exon and even higher than the diversity within the intron. Second, the amino acid diversity of antigen B is much higher than its genomic nucleotide diversity. If introns evolve in a neutral fashion, they should bear higher diversities than exons, since purifying selection in coding regions eliminates most incoming mutations; indeed, this is the case for most genes (Li, 1997). However, if selection acts in favor of mutations (positive selection) a higher rate of substitutions in exons is possible. This pattern of substitution has been found, for example, in protozoan parasite surface proteins (Escalante et al., 1998). Positive selection, probably exerted by host immune response, seems to explain the evolution of the AgB8/1 (Haag et al., 1998), and it could also explain the high diversity values found in the present study. More detailed studies will be performed to test this hypothesis.

Considering the observed differences between antigens AgB8/1 and AgB8/2, it was important to assess their diagnostic value's and compare them to that of native antigen B. Our results showed significant differences in the diagnostic value of the recombinant antigens rAgB8/1 and rAgB8/2. Antigen rAgB8/2 presented a better performance in ELISA, showing a sensitivity of 83.87% and a specificity of 98.28%. The lower specificity of rAgB8/1 (80.17%) suggests that this subunit might be responsible for most of the overall lower specificity of the native antigen B preparation (81.9%) when compared to rAgB8/2. It is known that both antigens are present in protoscolexes (González et al., 1996), but the relative expression

level of each one remains to be determined. It is also not known in which proportion each subunit is represented within the polymers of antigen B. The possible occurrence of additional subunits in the antigen B complex has also been proposed (González et al., 1996). The performance differences of rAgB8/1 and rAgB8/2 in detecting antibodies in sera of hydatid disease patients may also explain the variability among the results achieved by different research groups who have used in their diagnostic tests, crude, or only partially purified, hydatid cyst fluid antigens from different host sources.

The results derived from testing rAgB8/2 against sera from patients infected with *E. multilocularis* and *E. vogeli* suggest that this antigen can be species-specific. No cross-reactions (with either rAgB8/1 or rAgB8/2) were observed with sera from patients infected with the cestode *T. solium*. Although further tests with a significantly greater number of homologous and heterologous sera are necessary, altogether these results suggest that both rAgB8/1 and rAgB8/2 might be useful in diagnosing CHD. They even allow the discrimination of some cross-reactions with sera from cysticercosis patients, a major problem in CHD immunodiagnosis (Rickard and Lightowers, 1986). rAgB8/2 yields less cross-reactions with schistosomiasis patients sera than rAgB8/1, even though this finding would not be so important in

regions like the cone of South America, where that disease is not prevalent (Dreyer, 1987; Rey, 1991) while hydatid disease is endemic (Matossian et al., 1977).

The values of sensitivity and specificity obtained for rAgB8/1 are similar to those obtained by other groups using similar sequences. Leggatt and McManus (1994) used AgB8/1, expressed as a GST fusion protein successfully, being able to detect 74% of the cases of CHD. Cross-reactions were observed in 25% of sera from AHD patients and in 22% of sera from schistosomiasis japonica patients. No cross-reactions were observed with sera from patients infected with *T. solium*. McVie et al. (1997) cloned and expressed, as a maltose-binding fusion protein, a 165 bp fragment that codes for the carboxi-terminal end of AgB8/1. The recombinant antigen showed overall sensitivity and specificity for CHD of 65 and 91%, respectively, in ELISA, while the native antigen B exhibited 63% of sensitivity and 81% of specificity. In the present study recombinant AgB8/1 showed a 50% cross-reactivity with sera from patients with AHD, but no reactivity with sera from individuals bearing other helminthic infections (schistosomiasis, onchocerciasis and cysticercosis) or from healthy individuals living either in CHD endemic or non-endemic regions. In the study done by Leggatt and McManus (1994), 22% of the sera from schistosomiasis patients reacted to

Table 2

Summary of the results obtained in ELISA tests using the recombinant antigens rAgB8/1 and rAgB8/2, native AgB and GU4 synthetic peptide

Tested patients sera	Number of sera	Number of positive sera			
		rAgB8/1	rAgB8/2	Native AgB	GU4 ^a
Hydatid disease (confirmed by surgery or diagnosed by DD5, Western, ELISA)	31	17	26	24	8
Alveolar hydatid disease (<i>E. multilocularis</i>)	7	5	0	7	
Polycystic hydatid disease (<i>E. vogeli</i>)	18	5	0	6	
Cysticercosis (<i>T. solium</i>)	17	0	0	0	
Schistosomiasis (<i>S. mansoni</i>)	37	11	1	5	
<i>Toxocara</i> spp.	8	1	1	1	
Clinically normal individuals	29	1	1	2	

^a Twenty CHD patients sera were tested with GU4 synthetic peptide. Nineteen of them recognized the rAgB8/2 antigen.

recombinant AgB8/1; in ours, 29% did so. In our study these reactions cannot be attributed to the GST portion since it has been removed from the recombinant protein.

Recently Barbieri et al. (1998) have tested six antigens (HCFA crude antigen, immunopurified AgB and Ag5, peptide 65, peptide 89–112 and peptide GU4) against a large sera collection. Peptide 65, a 26 aminoacids-long chain that mimics an epitope of AgB8/1 has been evaluated before (Leggatt and McManus, 1994). Peptide 89–122 is derived from antigen 5 and has been described previously by Chamekh et al. (1992). GU4 is a 34 aminoacids-long synthetic peptide corresponding to the carboxy terminus of AgB8/2. Antigens 5 and B presented a higher sensitivity than the derived peptides. It has been suggested that the lower diagnostic performance of synthetic peptides in comparison to full length antigens may be due to the loss of conformational epitopes, which occurs whenever the amino acid sequence is outside the environment provided by the rest of the protein molecule (Barbieri et al., 1998). The results obtained in this work using GU4 synthetic peptide are in agreement with the results from Barbieri et al. (1998), indicating that the overall antigen structure is important for recognition by the sera.

Our results indicate that recombinant antigen AgB8/2 presents a very good performance in detecting antibodies in sera from CHD patients. To our knowledge this antigen has the best sensitivity and specificity among the individual *E. granulosus* antigens analysed so far. However, tests with a larger number of specific and cross-reactive sera must be performed to confirm its diagnostic value. Such tests are currently under way in our laboratory.

Acknowledgements

We thank Drs Bruno Gottstein and Gualberto González for the kind gift of *E. multilocularis* patients sera and the native AgB and GU4 synthetic peptide, respectively. This work was supported by PADCT (620081/95-3), CNPq, FAPERGS.

References

- Barbieri, M., Fernández, V., González, G., Luaces, V.M., Nieto, A., 1998. Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 20, 51–61.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Chamekh, M., Gras-Masse, H., Bossus, M., et al., 1992. Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. *J. Clin. Invest.* 89, 458–464.
- Devereux, J., Haerberli, P., Smithies, O., 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12 (Pt. 1), 387–395.
- Dreyer, G., 1987. Filariasis program-Recife, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 359–360.
- Escalante, A.A., Lal, A.A., Ayala, F.J., 1998. Genetic polymorphism and natural selection in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Genetics* 149, 189–202.
- Fernández, V., Ferreira, H.B., Fernández, C., Zaha, A., Nieto, A., 1996. Molecular characterization of a novel 8 kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 247–250.
- Frosch, P., Hartmann, M., Mühschlegel, F., Frosch, M., 1994. Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64, 171–175.
- González, G., Nieto, A., Fernández, C., Örn, A., Wernstedt, C., Hellman, U., 1996. Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* 18, 587–596.
- Haag, K.L., Arafijo, A.M., Gottstein, B., Zaha, A., 1998. Selection recombination and history in a parasitic flatworm (*Echinococcus*) inferred from nucleotide sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93 (5), 695–702.
- Leggatt, G.R., McManus, D.P., 1994. Identification and diagnostic value of a major antibody epitope on the 12 kDa antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid. *Parasite Immunol.* 16, 87–96.
- Leggatt, G.R., Yang, W., McManus, D.P., 1992. Serological evaluation of the 12 kDa subunit of antigen B in *Echinococcus granulosus* cyst fluid by immunoblot analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 189–192.
- Li, W.E., 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Lightowers, M.W., Liu, D., Haralambous, A., Rickard, M., 1989. Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 171–182.
- Lightowers, M.W., Gottstein, B., 1995. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus* and Hydatid Disease. CAB International, Wallingford, pp. 355–410.

- Maddison, S.R., Slemenda, P.M., Schantz, P.M., Fried, J.A., Wilson, M., Tsang, V.C.W., 1989. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 377–383.
- Matossian, R.M., Rickard, M.D., Smyth, J.D., 1977. Hydatidosis: a global problem of increasing importance. *Bull. WHO* 55, 499–507.
- Mayer, R.J., Walker, J.H., 1987. *Immunological Methods in Cell and Molecular Biology*. Academic Press, London.
- McManus, D.P., Knight, M., Simpson, A.L.G., 1985. Isolation and characterization of nucleic acids from the hydatid organisms, *Echinococcus* spp. (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 251–266.
- McVie, A., Ersfeld, K., Rogan, M.T., Craig, P.S., 1997. Expression and immunological characterization of *Echinococcus granulosus* recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human echinococcosis. *Acta Trop.* 67, 19–35.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Oriol, C., Oriol, R., 1975. Physicochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 569–574.
- Oriol, R., Willians, J.F., Esandi, M.V.P., Oriol, C., 1971. Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569–574.
- Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E., Musiani, P., 1977. *Echinococcus granulosus*: identification of subunits of the major antigens. *J. Immunol.* 119, 1382–1386.
- Pozzuoli, R., Musiani, P., Arru, E., Piantelli, M., Mazzarella, R., 1972. *Echinococcus granulosus*: isolation and characterization of sheep hydatid fluid antigens. *Exp. Parasitol.* 32, 45–55.
- Rey, L., 1991. *Parasitologia*, 2nd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Rickard, M.D., Lightowers, M.W., 1986. Immunodiagnosis of hydatid disease. In: Thompson, R.C.A. (Ed.), *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease*. Allen and Unwin, London, pp. 217–249.
- Rozas, J., Rozas, R., 1997. DnaSP version 2.0; a novel software package for extensive molecular population genetic analysis. *Comput. Appl. Biosci.* 13, 307–311.
- Sanger, R., Nicklen, S., Coulson, A.X., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.
- Shepherd, J.C., Aitken, A., McManus, D.P., 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus*, inhibits elastase, activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90.
- Smith, D.B., Johnson, K.S., 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase fusion proteins. *Gene* 67, 31–40.
- Thompson, R.C.A., 1995. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Wallingford, pp. 1–50.
- Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Von Heijne, G., 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14, 4683–4690.