

ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS EM EXTRATOS AQUOSOS DE LARVA E ADULTOS DE TAENIA SOLIUM

I — IMUNOGENICIDADE E COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA

E. NASCIMENTO (1) e F. G. ARAÚJO (1)

R E S U M O

O extrato solúvel de escólex foi mais imunogênico que os extratos de líquido, larva total, *Taenia solium* adulta e membrana na hemaglutinação indireta. Todos apresentaram de 6 a 8 linhas de precipitação na dupla difusão. O extrato de escólex apresentou identidade imunológica com todas as linhas de precipitação do extrato de membrana e de líquido da larva de *Taenia solium*.

I N T R O D U Ç Ã O

A cisticercose humana é conhecida desde o Século XVI, sendo que a neurocisticercose foi descoberta por RUMLER¹⁹. Essa é freqüente nos países onde o consumo de carne de suínos é mais elevado. Assim, nos países europeus, a freqüência é maior na Alemanha, Polônia, Itália e França. Nos países asiáticos a freqüência maior é observada na Índia¹⁵. Nas Américas ela é largamente distribuída, sendo mais freqüente no México, onde a cisticercose é de grande importância por sua freqüência e pelas severas manifestações clínicas causadas. Em 3,5% das autópsias realizadas em pacientes com cisticercose no Hospital Geral da Cidade do México, 1,5% dos pacientes tinham esta doença como causa mortis e, onde ocupou o 9.º lugar como causa mortis⁴.

No Brasil, não é conhecida a prevalência atual dessa doença apesar de sua importância em nosso meio. Foi verificado que dos pacientes atendidos na Clínica Neurológica da Universidade de São Paulo, a incidência da neurocisticercose foi de 0,30%, no período de 1925 a 1940⁸ e de 0,36%, no período de 1940 a 1956³. Entre os pacientes que necessitaram internação no Hospital das Clínicas de São Paulo no pe-

ríodo de 1947 a 1955, 2,98% eram portadores de neurocisticercose²¹. Dados obtidos no Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais no período de 1964 a 1976, mostraram uma incidência de 0,55% em pacientes internados com problemas neurológicos decorrentes da infecção pelo *Cysticercus cellulosae*⁵.

O diagnóstico clínico da cisticercose é praticamente impossível de ser feito em pacientes assintomáticos estando sempre associado às alterações fisiológicas causadas pelos cisticercos. Nos casos de localização no sistema nervoso central (SNC) ou em infecções maciças na musculatura esquelética, o diagnóstico radiológico vem auxiliar o clínico, mas tal diagnóstico constitui problema; isto porque os parasitos nem sempre são evidenciados, havendo necessidade dos cisticercos estarem calcificados para melhor detecção pelo raio X. Uma tentativa de superação dessa dificuldade é a utilização de reações imunológicas como forma auxiliar do diagnóstico.

Várias técnicas são usadas para diagnosticar a cisticercose, entre elas, temos a fixação do

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

complemento (FC) 1,7,8,12,13,22,24, hemaglutinação indireta^{16,17}, imunofluorescência indireta¹¹, entretanto, estes Autores usaram como antígeno o extrato solúvel total ou particulado da larva de *Taenia solium*, não conseguindo especificidade satisfatória.

No presente trabalho, determinou-se a imunogenicidade, a composição antigênica, a concentração de proteínas e de carboidratos dos extratos solúveis do *C. cellulosa* total, escólex, líquido, membrana e *Taenia solium*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cysticercus cellulosa — foram obtidos do coração, língua e músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados, após dissecação das peças eles foram lavados em cinco banhos sucessivos contendo "Phosphate Buffer Saline" 0,15 M pH 7,2 (PBS). Os cisticercos íntegros foram colocados em frascos tipo penicilina e congelados a -70°C por 12 horas. A seguir foram liofilizados e triturados em gral de porcelana até transformarem-se em pó. Três gramas de pó assim obtido foram tratados com 100,0 ml de etanol absoluto a -70°C por 3 vezes com intervalos de 3 horas. Em seguida, o processo foi repetido utilizando-se éter etílico a -70°C. Após secagem em estufa 37°C, o material foi suspenso em 15,0 ml de PBS pH 7,2 e ultrasonicado por 3 vezes, durante 1 minuto a 40 hertz, com intervalos de 1 minuto entre cada ultrasonicação, seguido de centrifugação a 4800 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante denominado CC, foi distribuído em alíquotas de 3,0 ml e armazenado a -20°C.

Líquido vesicular — o líquido do interior das vesículas foi colhido com o auxílio de uma seringa descartável, com capacidade para 1,0 ml adaptada com agulha 15x10. Este procedimento foi realizado à temperatura ambiente.

O processo de deslipidização foi o mesmo usado para o extrato CC. O sedimento foi ressuspenso num volume de PBS igual à metade do volume inicial do líquido. Centrifugado a 4800 g e o sobrenadante, denominado LI foi armazenado a -20°C em alíquotas de 3,0 ml.

Membrana — foram obtidas por dissecação dos cisticercos com auxílio de bisturi e microscópio estereoscópico. O processo de extração usado foi o mesmo para o CC. O sobrenadante foi denominado ME.

Escólex — foram obtidos como ME e o processo de extração usado foi o mesmo para CC. O sobrenadante foi denominado ES.

Taenia solium — as *T. solium* (TS) foram obtidas de pacientes naturalmente infectados e tratados com Niclosamida (Yomesan, Bayer)¹⁸. As tênias, com exceção dos escólex foram lavadas cinco vezes em banhos sucessivos de água destilada e mais cinco banhos contendo PBS, liofilizadas e trituradas em gral de porcelana até transformarem-se em pó. Três gramas do pó assim obtido foram tratados com a mesma metodologia usada para CC.

Dosagens de proteínas e carboidratos — as dosagens de proteínas e carboidratos dos extratos foram feitas de acordo com os métodos de LOWRY & col.⁹ e SEIFTER & col.²⁰. Os resultados foram expressos em miligramas por cisticercos e suas porcentagens em relação ao cisticercos total.

Obtenção dos imune soros — para imunização, utilizou-se coelhos, machos, albinos, com quatro meses de idade aproximadamente. Foram inoculados três animais para cada extrato. Cada animal recebeu um inóculo contendo 1,0 mg de proteínas solubilizadas em 1,0 ml de PBS e emulsionadas com 1,0 ml de Adjuvante Incompleto de Freund (AIF). Os extratos foram inoculados por via subcutânea nos coxins plantares das patas anteriores e posteriores, sendo aplicado 0,5 ml da emulsão em cada pata. Aos 21 dias após a inoculação, uma segunda dose, contendo o equivalente a 200 mg de proteínas em 0,2 ml de PBS foi inoculada subcutaneamente no abdome. Foram colhidas amostras de sangue no 21.º e 28.º dias, sendo o soro separado por centrifugação a 170g a 4°C durante 20 minutos e dividido em alíquotas de 8,0 ml, sendo conservados a -20°C.

Dupla difusão — a técnica foi executada segundo OUCHTERLONY¹⁴ sendo utilizadas lâminas de vidro 7,5 x 2,0 cm, revestidas com 2,0 ml de ágar a 0,1% em água destilada. As lâminas foram cobertas com 3,0 ml de agarose a 1% em PBS 0,1 M pH7, 4, contendo 0,1% de azida sódica. Após solidificação, foram feitos três orifícios com 4,0 mm de diâmetro em disposição triangular com 6,0 mm de distância entre si. Os extratos apresentavam uma concentração de proteínas de 4,0 mg/ml e os imune soros foram diluídos de 1/10 até 1/100, sendo usada a diluição de acordo com a intensidade e visuali-

zação microscópica das precipitações na dupla difusão.

Em todas as reações, padronizou-se colocar o imune soro no orifício do vértice inferior e os extratos nos orifícios superiores. As lâminas eram colocadas imediatamente em câmaras umedecidas com solução aquosa de azida sódica a 0,05% em água destilada, permanecendo durante 48 horas à temperatura ambiente. As lâminas eram lavadas individualmente por três dias em placa de Petri 10x2 cm contendo solução salina (NaCl 0,15 M), sendo renovadas duas vezes ao dia. Após esse tratamento, estas eram lavadas em água destilada pelo mesmo período e fotografadas.

Hemaglutinação indireta — foi realizada segundo BOYDEN² e STAVITSKY²³, adaptada ao nosso sistema com a realização da técnica em "Microtiter". A leitura foi feita após duas horas à temperatura ambiente.

RESULTADOS

A Tabela I mostra a concentração de proteínas e de carboidratos dos extratos solúveis de LI, ME, ES e as porcentagens de cada um em relação ao extrato total CC. Observamos que em cada cisticerco as concentrações de proteínas estão assim distribuídas LI > ES > ME e para carboidratos LI > ME > ES.

TABELA I

Dosagem de proteínas e carboidratos nos extratos solúveis: Total (CC), Líquido (LI), Membrana (ME) e Escólex (ES)

Extratos	(*) Proteínas		(*) Carboidratos	
	mg/cisticerco	%	mg/cisticerco	%
CC	1,29	100,00	1,10	100,00
LI	0,58	44,96	0,54	49,09
ME	0,26	20,15	0,29	26,36
ES	0,45	34,89	0,27	24,55

(*) Média de três determinações

A Fig. 1 apresenta os níveis de anticorpos produzidos em coelhos e detectados pelo teste de hemaglutinação indireta. A média dos títulos de anticorpos e os desvios padrões foram calculados usando o antilogaritmo natural.

Com o intuito de analisarmos o relacionamento entre os componentes antigênicos dos extratos de *C. cellulosa* total (CC), líquido da vesícula (LI), membrana (ME) e escólex (ES),

tomamos por padrão um antígeno e seu imune soro homólogo, frente aos demais antígenos.

Na Fig. 2 e Tabela II, observamos as reações entre os imune soros anti-LI, anti-ME e anti-ES, e os antígenos LI, ME e ES na dupla difusão. Em tais reações observamos também o relacionamento antigênico de identidade total, parcial e falta de identidade entre os extratos antigênicos das partes da larva de *Taenia solium*.

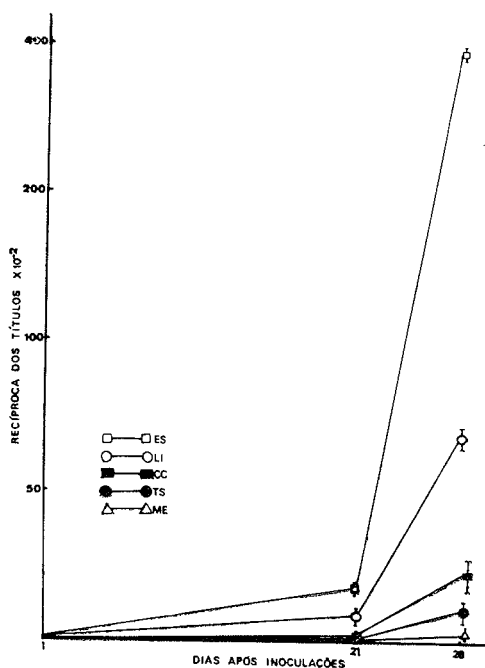


Fig. 1 — Variação dos níveis de anticorpos determinados pelo teste de hemaglutinação indireta em soros de coelhos imunizados com 1,0 mg de proteínas dos extratos solúveis de Escólex (ES), Líquido (LI), cisticerco *Cysticercus cellulosae* total (CC), *Taenia solium* (TS) e Membrana (ME) em Adjuvant Incompleto de Freund v/v

DISCUSSÃO

O *Cysticercus cellulosa* pode ser dividido facilmente em três partes; Líquido (LI), Membrana (ME) e Escólex (ES). Dessas partes, mais o *C. cellulosa* total (CC) extraíram-se componentes solúveis, cujas concentrações em proteínas e carboidratos estão representados na Tabela I. Na revisão da literatura realizada para o presente trabalho não foi encontrada qualquer referência sobre a concentração de proteínas e carboidratos nesses extratos, não permitindo portanto qualquer tipo de comparação

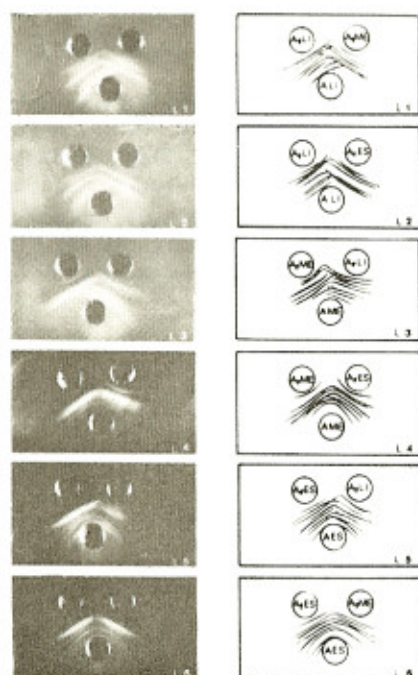


Fig. 2 — Dupla difusão e diagramas mostrando as linhas de precipitação entre os antígenos de Líquido (AgLI = antígeno), Membrana (AgME) Escólex (AgES) e seus imunes soros homólogos ALI, AME e AES (A = anticorpo) em relação aos mesmos antígenos

com os dados já conhecidos, constituindo portanto nossos dados, os primeiros relatos. A metodologia empregada para separação do *C. cellulosa* e extração da parte solúvel foi eficaz, permitindo basicamente a preservação de seus constituintes na forma nativa.

Entre os extratos CC, LI, ME e ES, procuramos medir a capacidade estimuladora da síntese de anticorpos. Verificamos que os soros obtidos de coelhos imunizados com o extrato ES e LI apresentaram maiores títulos de anticorpos detectáveis pelo teste de hemaglutinação indireta. Apesar da menor imunogenicidade, os demais extratos também induziram a formação de anticorpos. O fato do extrato ME encontrar-se entre os menos imunogênicos dos extratos testados, permite elaborar-se a hipótese de que, em algumas infecções por *Cysticercus cellulosa* a fraca reação inflamatória em torno da larva, quando ela está viva nos tecidos, se deve a baixa capacidade que o extrato de membrana apresenta em induzir a síntese de anticorpos. Tal hipótese é coerente com as observações de FLISSER & col.⁶ nas quais aproximadamente 50% dos pacientes com cisticercose comprovada não tiveram anticorpos contra *C. cellulosa* detectáveis pela imunoelektroforese.

T A B E L A II

(*) Reações de dupla difusão entre os antígenos LI, ME, ES e seus imunes soros homólogos em relação aos mesmos antígenos

Lâminas	N.º de linhas obtidas nas reações específicas	Antígenos comparados frente aos imunes soros	N.º de linhas obtidas	Identidades antigênicas		
				Total	Parcial	Ausência
L ₁	7	AgLI-anti-LI	5	1	1	3
L ₂	7	Anti-LI	5	3	1	1
L ₃	6	AgME-anti-ME	7	3	2	2
L ₄	6	Anti-ME	7	5	1	1
L ₅	8	AgES-anti-ES	7	5	2	—
L ₆	8	Anti-ES	6	5	—	1

(*) Resumo da Fig. 2

A alta capacidade imunogênica do extrato ES, como pode ser observada com clareza na Fig. 1 demonstra a existência no escólex de alguns componentes antigênicos responsáveis por parte da resposta imune na cisticercose. Em ordem decrescente de imunogenicidade o líquido ocupou a segunda posição (Fig. 1). Esse dado não nos surpreendeu visto que ele é concordante

com o trabalho de MACHNICKA¹⁰, que obteve bons resultados usando o líquido da vesícula como antígeno no teste de hemaglutinação indireta para detectar anticorpos anticisticercos.

A baixa imunogenicidade observada para os extratos CC e TS poderia ser explicada pelo número e concentração de seus componentes

antigênicos. Tais fatores poderiam levar a uma competição antigênica resultando em menor quantidade de anticorpos induzidos pelo extrato total em relação ao observado nos animais que foram imunizados com as partes do *C. cellulosa*. Alternativamente, os extratos totais poderiam conter entre seus componentes algum fator com atividade indutora da imunossupressão, ultrapassando a capacidade indutora da síntese de anticorpos dos demais componentes. Hipótese semelhante foi sugerida por FLISSER & col.⁶, em pacientes com cisticercose.

Na determinação da composição antigênica desses extratos, a ME foi a que apresentou menor número de linhas de precipitação seguido dos extratos CC, LI e ES, com maior número de linhas na dupla difusão. Esses resultados não concordam com os dados de ZYNGIER²⁵ que obteve 5 linhas na dupla difusão com o extrato total da larva de *T. solium*.

No relacionamento antigênico entre os componentes da larva estão presente várias linhas de precipitação com identidade antigênicas, com exceção das reações entre o imune soro anti-LI e antígeno da ME, onde são observadas três linhas com ausência de identidade, uma com identidade parcial e outra com identidade total, sugerindo que existem diferenças entre os componentes antigênicos da membrana e do líquido (Fig. 2 e Tabela II). Estas diferenças estão também evidentes quando o imune soro anti-ME reage com o antígeno de LI, apresentando simultaneamente 2 linhas com identidade parcial e 2 com ausência de identidade. Nas demais reações houve predomínio de identidades sorológicas.

O antígeno ES além de apresentar menor número de linhas com ausência de identidade, quando comparado aos antígenos LI, ME (Fig. 2, Tabela II), foi o que se identificou com todos os componentes antigênicos do LI e da ME, como pode ser observado nas lâminas L₅ e L₆ (Fig. 2).

Um fato curioso foi observado na reação homóloga ME-anti-ME onde detectamos 6 linhas de precipitação. Entretanto, quando o imune soro anti-ME foi colocado frente aos antígenos LI e ES observamos em ambos 7 linhas de precipitação (Fig. 2 e Tabela II). Tal fato poderia ser explicado pela produção de anticorpos específicos para um único componente da

membrana que por sua vez detectaria um ou mais antígenos do LI ou do ES devido à semelhança de determinantes antigênicos na molécula. Outra hipótese seria a de que o antígeno ME, possivelmente devido a sua complexa natureza química ou o imune soro anti-ME, não estaria em concentração ótima para ocorrer formação do complexo Ag-Ac, com consequente precipitação.

SUMMARY

Immunochemical studies on aqueous extracts of the larvae and adults of *Taenia solium*. I — Immunogenicity and antigenic composition

Aqueous extracts were prepared from adult *Taenia solium* without a scolex, whole larvae (*Cysticercus cellulosa*), and from parts of the larvae (vesicular liquid, membrane, scolices). Vesicular liquid accounted for 44.96% of protein and 49.09% of carbohydrate extracted from cysticerci. The larval membrane consisted of 20.15% of protein and 26.36% of carbohydrate contents of a cysticercus, whereas, scolices 34.89% and 24.55% respectively. Indirect haemagglutination tests were performed 28 days after rabbits had been inoculated with different aqueous extracts. Very high antibody level was recorded in animals that received scolex extracts. Moderate antibody titres were observed in rabbits inoculated with vesicular liquid extracts. Animals inoculated with extracts derived from whole (apart from scolices) adults, whole larvae or larval membranes gave low immunological responses. The various aqueous extracts produced 6-8 precipitation lines in double diffusion Ouchterlony tests. Extracts from scolices showed antigenicity identical with all the precipitation lines produced by membrane and vesicular liquid extracts.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIAGI F. F.; NAVARRETE, F.; PINA, A.; SANTIAGO, A. M. & TAPIA, L. — Estudio de tres reacciones sorológicas en el diagnóstico de la cisticercosis. Rev. Med. Hosp. General (México) 11: 501-508, 1961.
2. BOYDEN, S. — The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and the subsequent hemagglutination by antiprotein serum. J. Exp. Med. 93: 107, 1951.
3. BROTTTO, W. — Aspectos neurológicos da cisticercose. Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo) 5: 258, 1947.

4. BRICEÑO, C. E.; BIAGI, F. & MARTINEZ, B. — Cisticercose: Observaciones sobre 97 casos de autopsia. *Prensa Med. Mex. (México)* 5: 192-197, 1961.
5. CABRAL-FILHO, G. — Comunicação pessoal. Departamento de Neurologia do Hospital das Clínicas da U.F.M.G. Belo Horizonte, Minas Gerais, 1978.
6. FLISSER, A.; WOODHOUSE, E. & LARRALDE, C. — Imunodiagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *V. Congresso Latino-Americano de Parasitologia*. Buenos Aires, Argentina, 1979, pp. 161.
7. GUCCIONE — In: SPINA-FRANÇA, A. — Aspectos biológicos na Neurocisticercose. Alterações do líquido cefalorraquidiano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 20: 17-30, 1962.
8. LANGE, O. — Síndrome líquórica da cisticercose encefalomeníngea. *Rev. Neurol. Psiquiat.* (São Paulo) 6: 35, 1940.
9. LOWRY, O. H.; ROSEMBROUCH, N. J.; FARR, L. & RONNAOALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
10. MACHNICKA, B. — Studies on antigen common to *Cysticercus bovis* and *Taenia saginata*. *Parasitic Zoonoses Clinical and Experimental Studies*. Polarol Edited by E.I.L. Soulsby. New York, Academic Press Inc. 1974, pp. 213-221.
11. MACHADO, A. J.; CAMARGO, M. E. & HOSHINO, S. — Reação de imunofluorescência para a cisticercose com partículas de *Cysticercus cellulosae* fixadas a lâminas de microscopia. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 7: 181-182, 1973.
12. MAGALHÃES, A. E. A. — Reação de fixação de complemento para cisticercose no líquido cefalorraquidiano. Emprego de novo antígeno por método quantitativo. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 15: 183-189, 1957.
13. MOSES — (1911). In: SPINA-FRANÇA, A. — Aspectos biológicos da Neurocisticercose. Alterações do líquido cefalorraquidiano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 20: 17-30, 1962.
14. OUCHTERLONY, O. — In: *Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis*. Ann. Science Publ. Ann Arbor, Mich. USA, 1968.
15. PESSOA, S. B. & MARTINS, A. V. — *Parasitologia Médica*. 10a. edição. Rio, Guanabara Koogan 36: 501-519, 1977.
16. POWELL, S. J.; PROCTOR, E. M.; WILMONT, A. J. & BARMETT, A. M. — Neurological complications of cysticercosis in Africans: a clinical and serological study Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60: 146-151, 1966.
17. PROCTOR, E. M.; POWELL, S. J. & ELSDON-DEW, E. — The serological diagnosis of cisticercosis in Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 60: 146-151, 1966.
18. PAWLOWSKI, Z. & SCHULTZ, M. G. — Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). *Adv. Parasitol.* 10: 269-343, 1972.
19. RUMLER — (1558) — In: SPINA-FRANÇA, A. — Aspectos biológicos da Neurocisticercose. Alterações do líquido cefalorraquidiano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 20: 17-30, 1962.
20. SEIFTER, S.; DAYTON, S.; NOVIE, B. & MUNIWCY-ÇER, E. — The estimation of glycogen with Anthrone reagent. *Arch. Bio-chem.* 25: 191-200, 1950.
21. SPINA-FRANÇA, A. — Cisticercose do sistema nervoso central. Considerações sobre 50 casos. *Rev. Paul. Med.* 48: 59-70, 1956.
22. SPINA-FRANÇA, A. — Aspectos biológicos da Neurocisticercose. Alterações do líquido cefalorraquidiano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 20: 17-30, 1962.
23. STAVITSKY, A. B. — Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with Tannic Acid and Protein-Treated blood cells. II — Specific applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition. *Depart. Micr. Med. Univ. Cleveland (Ohio)* 72: 360-375, 1953.
24. WEIMBERG — (1909) — In: MAGALHÃES, A. E. A. — Reação da fixação de complemento para cisticercose no líquido cefalorraquidiano. Emprego de novo antígeno por método quantitativo. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 15: 183-189, 1957.
25. ZINGIER, F. R. — Caracterização de extrato de *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.* 10: 55-58, 1976.

Recebido para publicação em 3/6/1981.