

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA ANTÍGENOS DE
METACESTÓIDES DE *Taenia saginata***

JOSY CAMPANHÃ VICENTINI DE OLIVEIRA

Botucatu - SP
Julho/2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA ANTÍGENOS DE
METACESTÓIDES DE *Taenia saginata*

JOSY CAMPANHÃ VICENTINI DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cáris Maroni Nunes
Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Elenice Deffune

Botucatu - SP
Julho/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Vicentini-Oliveira, Josy Campanhã.

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de metacestóides de *Taenia saginata* / Josy Campanhã Vicentini de Oliveira. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Cárís Maroni Nunes

Co-orientador: Elenice Deffune

Assunto CAPES: 50502018

1. Bovino - Doenças 2. Cisticercose - Epidemiologia 3. Carne - Inspeção

CDD 636.20896

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal; Cisticercose bovina; *Taenia saginata*.

Nome do Autor: Josy Campanhã Vicentini de Oliveira

Título: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS CONTRA ANTÍGENOS DE METACESTÓIDES DE *Taenia*
saginata

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^aDr^a Cáris Maroni Nunes
Presidente e Orientadora
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal
FOA – UNESP – Araçatuba

Prof^aDr^a Valéria Marçal Félix de Lima
Membro
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal
FOA – UNESP – Araçatuba

Prof^aDr^a Rosana Rossi Ferreira
Membro
Departamento de Ciências Biológicas
FC – UNESP – Bauru

Data da Defesa: 2 de julho de 2009.

Dedicatória

Ao meu pai Luiz Gonzaga, exemplo de honestidade e perseverança. Guerreiro na luta pela minha formação educacional e de meus irmãos. Saiba que é um vencedor!

À minha mãe Alda, exemplo de determinação, fé e amor. Mulher de fibra, lutadora ao lado de meu pai e refúgio para os momentos difíceis.

Aos meus irmãos, Fernando, Marcelo, Renata, Luíza e Luiz Gonzaga, pessoas tão importantes em minha vida.

Ao meu marido, João Guilherme, meu grande, eterno e único amor!

Aos meus segundos pais, Benedicto e Irene, exemplo de união e amor.

Agradecimientos

À Dra. Cáris Maroni Nunes, minha orientadora, por toda a confiança depositada em meu trabalho. Pela amizade, carinho, compreensão e pelo conhecimento que me acrescentou. Tenho grande admiração por você e um enorme carinho!

À Dra. Elenice Deffune, minha co-orientadora, por me abrir as portas de seu laboratório, pelos ensinamentos e todo o tempo dedicado à execução deste trabalho. Meu carinho e gratidão eternos!

À Dra. Rosana Rossi Ferreira, pela amizade sincera, caronas diárias, conversas agradáveis e conselhos sábios. Tenho orgulho de poder compartilhar de sua amizade.

Ao Dr. Germano Francisco Biondi, que intermediou essa orientação, muito obrigada pela colaboração, dedicação e carinho!

Ao Dr. Luis Carlos Scandarolli, por possibilitar a coleta dos cistos no frigorífico de sua responsabilidade (SIF-2960), e a toda equipe de funcionários do Frigorífico Frigol.

Ao Frigorífico Interbeef Ltda (SIF 1885) e toda a equipe por contribuir com a coleta de cistos.

Ao Biotério do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB (UNESP-Botucatu) e ao Infectório do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da FOA (UNESP-Araçatuba) pela manutenção dos animais utilizados para esta pesquisa.

À toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Andrei, Alexandro, Aline, Daniel, Gabrielle, Priscila, Renan, Tata, Thaiane e Vitória, por toda a ajuda dispensada para a realização desta pesquisa e pelo companheirismo!

À Tata, pelo zelo com que cuidou de minhas células (minhas filhas!), por ter me ensinado cultura celular e pelos finais de semana e feriados que abdicou de seu tempo para estar ao meu lado no laboratório de cultura celular. Com carinho, o meu muito obrigada!

Ao colega Andrei, pelo suporte oferecido na época de meu casamento e testes ELISA realizados.

À minha amiga Priscila Murador por seu exemplo de inteligência e dedicação, por todos os momentos de descontração e companhia na hora do almoço. Muito obrigada por sua amizade!

Às minhas queridas Gabi e Vitória, pelo auxílio indispensável nas atividades. Vocês formam uma dupla incrível! Muito obrigada, meninas, pela amizade, ajuda na cultura celular, nas purificações e em todas as dificuldades. A vocês minha gratidão!

Ao Daniel, que por muitas vezes parou suas atividades para me ajudar, muito obrigada!

Ao Valdir, por seu auxílio nas técnicas de eletroforese e toda a ajuda oferecida! Saiba que meu carinho por você é como por um irmão.

À Dra. Márjorie de Assis Golim pelo suporte na realização da citometria de fluxo e pela amizade.

À Léia, pelos momentos de descontração, incentivo e companheirismo.

Ao Carlinhos, pelo cuidado com que cuidou dos camundongos utilizados neste trabalho e pelo auxílio nas atividades que os envolveram. Obrigada por sua dedicação!

Ao Pedro Luís Florindo, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pelo auxílio nas coletas de cisticercos e cuidado com os coelhos utilizados nesta pesquisa.

A toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UNESP-Araçatuba) Altair, Amanda, Érica, Rodrigo, Valquíria, em especial à Silvana, por toda a colaboração. Sem a ajuda de vocês o sucesso desse trabalho estaria comprometido.

À Profa. Dra. Juliana Peiró pela ajuda em momentos críticos na realização da pesquisa.

À Profa. Cristina Monteiro da Silva, Marta Paccanaro Peres, Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto, Janaína e Patrícia de Athayde Barnabé, Profa. Marta Paccanaro Peres, Janaína e Patricia de Athayde Barnabé, Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti e Dra. Alessandra Mara Alves Ragozo por todo o apoio para realização das imunofluorescências. Sem colaboração e companheirismo não há pesquisa bem sucedida! Obrigada!

Ao Prof. João Pessoa pelas contribuições científicas.

À Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini e todos do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro (FMB-UNESP-Botucatu), em especial à Chiara pela contribuição.

À equipe do Laboratório de Sorologia do Hemocentro (FMB-UNESP-Botucatu), em especial, à Ângela Aparecida Dorini pelo carinho e por toda a assistência durante as realizações dos testes ELISA.

À Profa. Dra. Sheila Canevese Rahal (Coordenadora da Pós-Graduação) e toda a equipe da Pós-Graduação da FMVZ, José Roberto, Maria e Patrícia pelo carinho e toda assistência durante o curso de pós-graduação.

À Janice, Rita, Cléo, Dani, Marcelly, Marcelo e Esmite pelo apoio durante a realização deste trabalho e companheirismo durante nosso convívio.

À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.

Ao José Fernando, Cáris, Lara e Maria por me acolherem em sua casa e fazer com que estes momentos fossem os mais agradáveis possíveis.

Aos meus pais e irmãos pela força em todos os momentos, pelos conselhos e carinho que sempre recebi. Amo muito todos vocês!

Aos meus avós, tios e primos pela torcida e por dividirem comigo essa conquista.

À minha nova família, meus sogros Benedicto e Irene, cunhados e sobrinhos, pelo incentivo, apoio nos momentos difíceis e todos os momentos felizes compartilhados.

Aos queridos Bel, Du e Bruna, pelo apoio imprescindível no início da pós-graduação. Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim.

Aos pequeninos sobrinhos, meus anjos queridos, por me proporcionarem momentos de descontração ao me tirar dos estudos para irmos brincar um pouco. Vocês são muito especiais pra mim.

Ao meu esposo, João Guilherme de Oliveira, por seu apoio incondicional e por tudo o que representa em minha vida.

A todos os amigos, por torcerem e acreditarem em meu sucesso.

Aos animais, pois sem eles essa pesquisa não seria possível.

A Deus, por guiar meus passos, iluminar meus caminhos e me proporcionar grandes alegrias.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para esta pesquisa.

Epígrafe

“Escolhe um trabalho de que gostes,
e não terás que trabalhar nem um dia na
tua vida” (Confúcio)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Prevalência da cisticercose bovina em diferentes Unidades de Federação segundo o ano de observação.....	12
Quadro 2 -	Agenda de imunização para produção de soro hiperimune em coelhos.....	26
Quadro 3 -	Protocolo de imunização em camundongos BALB/c com extrato total e fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i>	29
Quadro 4 -	Caracterização da reatividade segundo a densidade ótica.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração protéica e volume obtido dos extratos antigênicos de <i>Taenia saginata</i>	41
Tabela 2 -	Híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato total de <i>Taenia saginata</i> (TAEB), segundo o rendimento.....	42
Tabela 3 -	Híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i> (TAEF), segundo o rendimento.....	43
Tabela 4 -	Número de híbridos selecionados nos quatro testes de ELISA indireto para o protocolo de imunização dos camundongos com o extrato total de <i>Taenia saginata</i> (TAEB).....	44
Tabela 5 -	Número de híbridos selecionados nos quatro testes ELISA indireto para o protocolo de imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i> (TAEF).....	44
Tabela 6 -	Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-extrato total de <i>T. saginata</i> no quarto teste de triagem por ELISA indireto.....	45
Tabela 7 -	Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-fluido vesicular de <i>T. saginata</i> no quarto teste de triagem por ELISA indireto.....	45
Tabela 8 -	Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato total de <i>Taenia saginata</i> (TAEB) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por ELISA indireto.	48
Tabela 9 -	Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i> (TAEF) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por ELISA indireto.....	49

Tabela 10 - Classe e sub-classe, determinada por citometria de fluxo, dos anticorpos produzidos pelos clones obtidos nos protocolos de imunização com extrato total de <i>Taenia saginata</i> (TAEB) e com extrato de fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i> (TAEF).....	50
Tabela 11 - Produção de líquido ascítico em camundongos BALB/c inoculados com clones produtores de imunoglobulina anti-extrato total de <i>Taenia saginata</i> ,segundo o número de camundongos inoculados e o volume produzido.....	53
Tabela 12 - Produção de líquido ascítico em camundongos BALB/c inoculados com clones produtores de imunoglobulina anti-fluido vesicular <i>Taenia saginata</i> , segundo o número de camundongos inoculados e o volume produzido.....	53
Tabela 13 - Reatividade imunológica, ao western blotting, dos anticorpos monoclonais produzidos frente ao antígeno homólogo de <i>Taenia saginata</i> , e a respectiva classe e subclasse.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo evolutivo da <i>Taenia saginata</i> (Fonte: <i>Center for disease Control – USA</i>).....	10
Figura 2 -	Ilustração do processo de fusão celular, formação de hibridomas e clones produtores de anticorpo monoclonal.....	16
Figura 3 -	Detalhe do tecido muscular bovino contendo a forma metacestóide de <i>Taenia saginata</i>	23
Figura 4 -	Esquematização do teste ELISA indireto	32
Figura 5 -	Esquematização da técnica de Imunofluorescência indireta (IFI).....	39
Figura 6 -	Clones produzidos no experimento. Clones únicos (A), clones múltiplos (B).....	47
Figura 7 -	Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas pelo método <i>CBAFlow</i> (BD Bioscience®). Controle negativo (A), controle positivo para IgG1, IgG2b, IgA, IgE (B), controle positivo para IgG2a, IgG3, IgM (C), amostra clone TAEB 3 – 16A6 (D), clone TAEB 1 – 40A3 (E), clone TAEB 1 – 40A4 (F).....	51
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agar a 1% em lâmina de vidro. (A) fração não purificada (líquido ascítico); (B) fração purificada.....	54
Figura 9 -	Gráfico de leitura do aparelho AktaPrime® durante a purificação de líquido ascítico do clone TAEF 2 – 270A2, classe/subclasse IgG ₁	55
Figura 10 -	Gráfico de leitura do aparelho AktaPrime® durante a purificação de líquido ascítico do clone TAEB 1 – 53A4, classe IgM.....	56
Figura 11 -	Separação das frações protéicas dos dois extratos antigênicos obtidos. PM – padrão de peso molecular (Sigma); Extrato fluido vesicular (1); Extrato total (2).....	57

- Figura 12 - Western blotting para teste de reação dos anticorpos obtidos em líquido ascítico frente ao antígeno homólogo (A) extrato total de *T. saginata* (B) extrato de fluido vesicular de *T. saginata*. Em A, reação dos anticorpos produzidos pelos clones: TAEB4 - 196A4 (1); TAEB1 - 53A4 (2); TAEB2 - 14A1 (3); TAEB2 - 14A2 purificado (4); soro de bovino com cisticercose generalizada (5). Em B, soro policlonal do coelho (1); soro pré-imunização do coelho (2); clones: TAEF2 - 137A1 (3); TAEF2 - 137A6 (4); TAEF2 - 253A5 (5); TAEF 2 - 270A2 (6); TAEF 3 - 134A3 (7). À esquerda das imagens o padrão de peso molecular (Sigma®)..... 58
- Figura 13 - Western blotting para teste de reação dos anticorpos obtidos em sobrenadante de cultura (SNC) e líquido ascítico frente ao antígeno homólogo extrato total de *T. saginata*. SNC clone TAEB2 - 14A1 (1); líquido ascítico clone TAEB2 - 14A1 (2); SNC clone TAEB2 - 14A2 (3); líquido ascítico clone TAEB2 - 14A2 (4); SNC clone TAEB1 - 40A3 (5); líquido ascítico clone TAEB1 - 40A3 (6). À esquerda o padrão de peso molecular (Sigma®)..... 59
- Figura 14 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato total de *Taenia saginata* TAEB 2 - 14A2, em líquido ascítico de camundongo (A) e submetido à coloração de Hematoxilina-Eosina (B). (aumento de 10x)..... 61
- Figura 15 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* TAEF 2 - 270A2, em líquido ascítico de camundongo (A) e submetido à coloração de Hematoxilina-Eosina (B). Setas indicam a reatividade em áreas do escólex do parasita. (aumento de 10x)..... 62
- Figura 16 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato bruto TAEB 2 - 14A2 (A) e anti-extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* TAEF 2 - 270A2 (B). Setas indicam a reatividade em áreas da membrana vesicular do parasita. (aumento de 20x)..... 63

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 <i>Taenia saginata</i> : epidemiologia e transmissão	9
2.2 Anticorpos monoclonais e a cisticercose bovina	14
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1 Objetivos Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Obtenção dos Extratos Antigênicos.....	23
4.1.1 Obtenção do extrato antigênico total.....	24
4.1.2 Obtenção do extrato antigênico de fluido vesicular.....	24
4.2 Determinação da concentração protéica	24
4.3 Produção de anti-soro policlonal específico	25
4.4 Produção dos Anticorpos Monoclonais murinos.....	27
4.4.1 Imunização.....	28
4.4.2 Células de fusão	29
4.4.3 Fusão Celular.....	30
4.4.4 Seleção dos hibridomas (Triagem)	31
4.4.5 Expansão dos híbridos em cultura	33
4.4.6 Viabilidade celular	33
4.4.7 Clonagem.....	34
4.4.8 Determinação da classe das imunoglobulinas produzidas.....	34
4.4.9 Obtenção de anticorpos monoclonais por produção de líquido ascítico.....	35
4.4.10 Avaliação eletroforética da monoclonalidade.....	36
4.4.11 Purificação dos anticorpos monoclonais	36
4.7 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonas por imunofluorescência indireta.....	38
5. RESULTADOS.....	41

5.1 Determinação da concentração protéica dos extratos antigênicos.....	41
5.2 Anti-soro policlonal específico	41
5.3 Obtenção de anticorpos monoclonais	41
5.3.1 Triagem.....	43
5.3.2 Expansão dos híbridos em cultura	46
5.3.3 Clonagem.....	46
5.3.4 Determinação de classe e subclasse das imunoglobulinas pelo método de citometria de fluxo	50
5.3.5 Produção de líquido ascítico	52
5.3.6 Avaliação eletroforética da monoclonalidade	54
5.3.7 Purificação	55
5.4 Caracterização das frações protéicas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	56
5.5 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por <i>Western Blotting</i>	57
5.6 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por imunofluorescência indireta	60
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	71
8. PERSPECTIVAS.....	71
9. BIBLIOGRAFIA	73

Resumo

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de metacestóides de *Taenia saginata***. Botucatu, 2009. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A cisticercose é uma das principais causas de perdas econômicas na pecuária de corte brasileira devido às condenações da carne para o controle do complexo teníase-cisticercose. O tratamento quimioterápico pode ser utilizado para o controle da infecção nos animais, mas sua eficácia deve ser monitorada por testes de diagnóstico que detectem parasitas vivos ou seus produtos. Na presente pesquisa, anticorpos monoclonais contra antígenos totais (TAEB) e de fluido vesicular (TAEF) de metacestóides de *Taenia saginata* foram produzidos através de fusão celular, utilizando-se células de baço de camundongos BALB/c imunizados. Cinco fusões TAEB e quatro TAEF foram realizadas e os sobrenadantes de cultura foram triados por teste ELISA indireto. Dez e nove híbridos pertencentes aos protocolos TAEB e TAEF, respectivamente, foram selecionados e clonados. As linhagens celulares clonadas foram mantidas em meio de cultura para a obtenção dos anticorpos monoclonais, resultando em 18 clones IgG₁ e 32 IgM reativos para TAEB e 9 IgG₁ e 9 IgM para TAEF. Dentre esses clones, 5 do protocolo TAEB e 5 TAEF foram selecionados para produção de líquido ascítico, através da injeção dos clones em camundongos BALB/c. A avaliação da identificação antigênica dos anticorpos produzidos aos antígenos homólogos foi realizada por meio de *western blotting*, resultando em reatividade com frações protéicas de baixo peso molecular (< 18kDa), 43, 55, 66 e 100kDa. A imunofluorescência indireta demonstrou que os anticorpos monoclonais avaliados reconhecem antígenos presentes tanto do escólex quanto da membrana vesicular de metacestóides de bovinos naturalmente infectados. Os anticorpos monoclonais produzidos poderão ser utilizados para detecção de antígenos circulantes na avaliação da eficácia do tratamento de bovinos infectados, evitando assim perdas econômicas e danos à saúde pública.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, *Taenia saginata*, cisticercose bovina.

Abstract

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens.** Botucatu, 2009. 88p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Cysticercosis is a major cause of economic losses in the Brazilian bovine chain production due to meat condemnation for the taeniasis-cysticercosis complex control. Chemotherapy can be used to control infection in cattle but treatment efficacy should be monitored by diagnostic tests that can detect live parasites or their products. Monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode crude (TAEB) and cyst fluid (TAEF) antigens were produced by cell fusion procedures using spleen cells from immunized BALB / c mice. Five TAEB and four TAEF fusions were performed and the culture supernatants from these cell cultures were screened by indirect ELISA assay. Ten TAEB and nine TAEF hybrids were selected and cloned. Cloned cell lines were grown in culture medium to collect the monoclonal antibodies, resulting in 18 IgG₁ and 32 IgM clones reactive to TAEB and 9 IgG₁ and 9 IgM clones reactive to TAEF. Five TAEB and five TAEF clones were selected for ascitic fluid production by injection in BALB/c mice and further harvesting. *Western blotting* was performed to test the antigenic identification by the antibodies produced resulting in reactivity to protein fractions of low molecular weight (<18kDa) and to 43, 55, 66 and 100kDa. The indirect immunofluorescence test showed that monoclonal antibodies recognize antigens from both the scolex and the bladder wall of metadestodes from naturally infected bovine. The monoclonal antibodies obtained can be useful for detection of circulant antigens in treatment efficacy evaluation preventing economic losses and public health injury.

Keywords: monoclonal antibody, *Taenia saginata*, bovine cysticercosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina é uma parasitose que apresenta distribuição mundial e no Brasil, maior produtor de carne bovina, tem se revelado um fator preocupante uma vez que é relatada como uma das principais causas de perdas econômicas por condenações das carcaças. Ainda assim sabe-se que a inspeção da carne bovina não é suficiente para controlar a transmissão da *Taenia saginata* ao homem, por apresentar um limiar de detecção limitado quando os animais são pouco infectados. Sendo assim, o tratamento terapêutico dos bovinos é uma medida de controle bastante útil e cuja eficiência poderia ser incrementada se pudesse ser utilizado associado a métodos que diagnosticassem a presença do parasita vivo ou seus produtos.

A detecção de antígenos circulantes baseada no uso de anticorpo monoclonal é uma alternativa interessante, pois permite o monitoramento do tratamento quimioterápico, além de diferenciar infecções crônicas de recentes. A partir dessa observação, algumas pesquisas utilizando anticorpos monoclonais (AcMm) para diagnóstico da cisticercose bovina foram realizadas com sucesso para a detecção de antígenos de *T. saginata* circulantes em bovinos, especialmente para animais experimentalmente infectados. Dentre estes, há frações de peso molecular entre 255kDa e 12kDa, na dependência do extrato antigênico ser oriundo de membrana, fluido vesicular ou produto de excreção-secreção do parasita. Com a grande sensibilidade e especificidade proporcionada pelos AcMm é possível seu emprego na detecção da neurocisticercose humana e cisticercose suína, já que muitos epítomos são semelhantes entre as espécies de *Taenia*.

Tendo em vista as considerações acima e o fato de que o desenvolvimento de ensaio baseado na busca de antígenos expressos pelas formas metacestóides de *T. saginata* contribuirá para a identificação precoce dos animais infectados, esta pesquisa foi delineada. A obtenção de tais AcMm e sua utilização no desenvolvimento de um teste Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) para diagnóstico da cisticercose bovina poderá

contribuir para diminuição das perdas econômicas e minimização dos riscos para a saúde pública tornando-se uma importante ferramenta epidemiológica.

Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Taenia saginata*: **epidemiologia e transmissão**

O complexo teníase-cisticercose é uma zoonose de grande importância para saúde pública e para o setor agropecuário em diversos países do mundo (THEIS et al., 1996; CAIXETA et al., 2004; OIE, 2005).

O ser humano é o único hospedeiro definitivo e obrigatório da *Taenia saginata*, capaz de albergar em seu intestino a forma adulta do cestóide, desenvolvendo a doença denominada teníase. A forma metacestóide (*Cysticercus bovis*) é encontrada na musculatura e vísceras de bovinos e bubalinos, hospedeiros intermediários do parasita, causando-lhes a cisticercose (ACHA & SZYFRES, 1986; NEVES, 1998; PAWLOWSKI, 1982; SOULSBY, 1982).

O homem pode se infectar através da ingestão de carne bovina crua ou mal cozida contendo cisticercos. A larva se fixa na parede intestinal onde se desenvolve até a fase adulta. As proglotes contendo os ovos do helminto são eliminadas juntamente com as fezes, podendo também sair espontaneamente devido às contrações intestinais, sendo encontradas até mesmo nas roupas de cama, roupas íntimas ou pijamas (PAWLOWSKI, 1982; FORTES, 1997; NEVES, 1998). A forma de infecção para o bovino, por sua vez, ocorre pela ingestão de água ou pastagens contaminadas com ovos de *T. saginata*. Os ovos sofrem ação das enzimas do abomaso, liberam as oncosferas, que sofrem ativação pelos sais biliares, permitindo a penetração nas vilosidades intestinais. As oncosferas invadem a corrente sanguínea até chegarem a órgãos e tecidos, nos quais se transformarão em cisticercos (Figura 1). Os principais locais onde são encontrados cisticercos nos bovinos são coração, músculo masseter e língua (FORTES, 1997; NEVES, 1998).

Desde a década de 70, os estudos epidemiológicos assinalam um aumento da prevalência da infecção por *T. saginata* em diferentes países que, até então, haviam registrado índices baixos. Em países europeus, este aumento foi justificado, além dos fatores já citados, pela popularidade de pratos feitos a base de carne bovina crua e maior trânsito de pessoas pela migração e turismo desordenados (GEMMEL & JOHNSTONE, 1977; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 1979; PAWLOWSKI, 1982; SCHANTZ et al., 1994).

De acordo com dados da inspeção de carnes, a prevalência da cisticercose bovina varia entre 0,01 e 6,8% em diversos países da Europa (ABUSEIR et al., 2006), mas imagina-se que a atual prevalência seja entre 3 a 10 vezes maior (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a; DORNY et al., 2000).

Dorny & Praet (2007) analisaram a situação da *T. saginata* na Europa e observaram que, apesar da sistemática inspeção de carne, a *T. saginata* persiste, muito embora a infecção por *Taenia solium* tenha sido erradicada, principalmente devido ao desenvolvimento sócio econômico geral e intensificação dos sistemas de criação de suínos.

No Brasil, esta zoonose tem sido um fator preocupante para a pecuária bovina de corte devido ao aumento da incidência em diferentes regiões do país, causando perdas econômicas consideráveis, no que se refere aos achados *post-mortem*, o que resulta em condenações parciais (tratamento pelo frio ou salga) ou totais das carcaças portadoras de cisticercose, acatando as recomendações contidas no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 1980, 1997). Este fato se reflete também na pecuária brasileira, limitando as possibilidades de exportação de carnes, diminuindo o prestígio como país produtor e o valor de seus produtos (FERNANDES & BUZETTI, 2001). Para o produtor de gado de corte, quando há a desclassificação das carcaças para exportação, a perda equivale a 10% do valor da arroba no dia (MARQUES et al, 2008).

A ocorrência desta parasitose no Brasil vem sendo observada nos frigoríficos sob Inspeção Federal ao longo dos anos, com taxas de prevalência que variam de estado para estado (Quadro 1).

QUADRO 1 - Prevalência da cisticercose bovina em diferentes Unidades da Federação segundo o ano de observação.

Pesquisador/ Ano de publicação	Porcentagem de cisticercose	Ano da pesquisa	Unidade da Federação
Ungar & Germano (1992)	5,50%	1986	São Paulo
Zampini (1994)	2,79%	1982 a 1988	Paraná
Pereira et al. (2006)	1,95%	1997 a 2003	Rio de Janeiro
Moreira dos Santos (1998)	4,43%	1998	Minas Gerais
Souza et al. (2007)	3,83%	2000	Paraná
Nunes, R.T. (2008)	1,40%	2006	Santa Catarina
Vollkopf & Xavier (2008)	0,16%	2007	Mato Grosso do Sul

Marques et al. (2008) avaliaram registros de condenação por cisticercose em bovinos abatidos em 2 frigoríficos da região centro-oeste do estado de São Paulo, segundo a origem, no período de 1996 a 2000. As prevalências observadas foram de 8,76% no estado de São Paulo, 7,53% no Paraná, 5,92% em Minas Gerais, 4,74% no Mato Grosso do Sul, 4,16% em Goiás e 0,71% em Mato Grosso. O estado de Tocantins apresentou o maior índice de cisticercose bovina (10,23%), entendida no trabalho como um caso esporádico e localizado, fruto da falta de saneamento básico na localidade e imigrações de portadores da teníase.

A longevidade da *T. saginata* e sua grande produção de ovos são características importantes na epidemiologia da doença. Um único hospedeiro pode eliminar até mais de 500 mil ovos diariamente, sejam nas proglotes ou livres nas fezes. Os ovos podem ser encontrados nas mãos, região perianal,

roupas pessoais e de cama de indivíduos parasitados (PAWLOWSKI, 1982). No meio ambiente, os ovos podem resistir mais ou menos tempo, dependendo da umidade relativa do ar e da temperatura ambiente. De forma geral, os ovos podem permanecer viáveis durante semanas e até meses (PAWLOWSKI & SCHULTZ, 1972; LAWSON & GEMMELL, 1983; GHEBREKIDAN, 1992).

As medidas de prevenção e controle do complexo teníase-cisticercose bovina devem abranger desde o diagnóstico *post-mortem* realizado junto aos estabelecimentos frigoríficos até o destino adequado das carcaças e vísceras comprometidas, evitando assim a transmissão da doença. Entretanto, sabe-se que a inspeção da carne bovina não é suficiente para eliminação da *T. saginata*. Esta técnica, apesar da grande contribuição epidemiológica, apresenta limiar de detecção limitado quando os animais são levemente infectados (KYVSGAARD et al., 1990; ONYANGO-ABUJE et al., 1996b; ABUSEIR, et al., 2006).

O tratamento terapêutico também pode ser considerado como alternativa potencialmente aplicável aos bovinos, como forma preventiva. No entanto, a inspeção da carne permite detectar a presença do parasita somente após a morte do animal, quando já não é possível evitar as perdas econômicas ou realizar o tratamento (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a).

Em geral, a sorologia para cisticercose bovina revela baixos níveis de anticorpos em animais que apresentam infecções leves e a intensidade de resposta imune observada nas infecções experimentais realizadas com administração de ovos de *T. saginata*, difere das infecções naturais, mesmo quando os animais recebem pequeno número de ovos, por longo período (KYVSGAARD et al., 1990; HAYUNGA et al., 1991; SMITH et al., 1991).

Os testes para detecção de anticorpos séricos indicam exposição do animal ao antígeno, mas não necessariamente infecção corrente (GARCIA et al., 2001; DORNY et al., 2003), podendo ser úteis em estudos epidemiológicos, porém sem atender à principal necessidade que é de detectar a presença de parasitas vivos ou seus produtos de secreção (HARRISON et al., 1989). Outra

desvantagem é que o anticorpo pode resultar falso-positivo, pois a imunoglobulina pode permanecer por longo tempo após a eliminação do parasita (HARRISON et al., 1989; GARCIA et al., 1997; DORNY et al., 2003). Sendo assim, a detecção do antígeno circulante baseado no uso de anticorpo monoclonal é uma alternativa interessante particularmente para o monitoramento do tratamento quimioterápico, além de permitir diferenciar infecções crônicas de recentes, já que detectam o antígeno (parasita) e não o anticorpo.

2.2 Anticorpos monoclonais e a cisticercose bovina

Anticorpos monoclonais (AcMm) são importantes ferramentas imunoquímicas. Suas principais características são especificidade de ligação, homogeneidade e a capacidade de serem produzidos em grandes quantidades.

A tecnologia de anticorpos monoclonais foi descrita pela primeira vez por Köhler e Milstein, em 1975. O método de produção desses anticorpos envolve a fusão de linfócitos B de animais previamente imunizados com o antígeno de interesse, e células neoplásicas em fase exponencial de crescimento (mieloma múltiplo). A fusão do linfócito B com o mieloma resulta em células denominadas “hibridomas” (Figura 2). Uma das principais vantagens sobre a produção dos hibridomas é que antígenos não purificados podem ser utilizados para a produção de anticorpos específicos (HARLOW & LANE, 1988).

Após a realização da fusão celular, três situações podem ocorrer: 1) células fusionadas (linfócito B do camundongo com mieloma múltiplo murino), objetivo dos protocolos de produção de anticorpos monoclonais, 2) células linfocitárias não fusionadas ou fusionadas ao acaso entre si e 3) mieloma múltiplo não fusionado ou fusionado ao acaso entre si. Somente a primeira formação é objetivada. As situações descritas em 2 e 3 devem ser eliminadas. Na situação 2, o problema é auto-limitado tendo em vista a pouca viabilidade de linfócitos normais em cultura a longo termo. Estas células linfocitárias entrarão normalmente em apoptose programada e serão eliminados das

culturas pelos processos de repicagem. Mas a terceira situação é preocupante, uma vez que o mieloma se divide rapidamente em cultura dificultando a seleção dos hibridomas. Utilizam-se então propriedades do genoma do mieloma incluindo a hipermetilação e a deficiência de uma enzima do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT), uma das enzimas da via de recuperação da síntese de nucleotídeos. Células normais são HGPRT positivas enquanto o genoma do mieloma é HGPRT negativo. Para regular esta etapa, utiliza-se a seleção enzimática dos hibridomas através do sistema Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT). Assim, 24 horas após a fusão é adicionado meio de cultura contendo o suplemento Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). A aminopterina bloqueia a via *de novo*, restando somente a via de recuperação a ser utilizada para a formação de nucleotídeos. No entanto, a hipoxantina pode ser utilizada na síntese somente por células HGPRT positivas, ou seja, hibridomas e linfócitos. Os mielomas contêm a proteína HGPRT não funcional e morrem nessas condições. Os linfócitos não fusionados possuem morte programada, o que permite a viabilidade na cultura somente dos hibridomas (HARLOW & LANE, 1988).

Nesta fase, há diversos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais diferentes em uma mesma colônia de células e por isso devem ser posteriormente submetidas ao processo de clonagem celular. Neste processo, objetiva-se a deposição de somente uma célula (clone) em cada cavidade da placa de cultura para crescimento de uma colônia composta por clones secretores de anticorpos específicos a um único determinante antigênico (epitopo) denominados monoespecíficos. Estes clones secretores são selecionados e amplificados para a obtenção de maiores volumes, na intenção de obter maiores concentrações do anticorpo, possibilitando a caracterização e uso do mesmo. Tanto após a fusão celular como após a etapa de clonagem celular, a fase de triagem (*screening*), ou seja, o teste delineado para estudo dos prováveis anticorpos obtidos é extremamente importante. O teste de triagem deve ser o mais próximo possível da forma futura de utilização do anticorpo monoclonal, facilitando a análise do desempenho desses anticorpos no teste escolhido. O teste ELISA indireto tem sido mais frequentemente utilizado para este fim, pois permite a rápida triagem dos hibridomas através de

seus sobrenadantes de cultura, já que costumeiramente são obtidos grande número dessas células. Além disso, a técnica é de fácil realização e o resultado do teste é obtido em até 4 horas (PRICE, 1995).

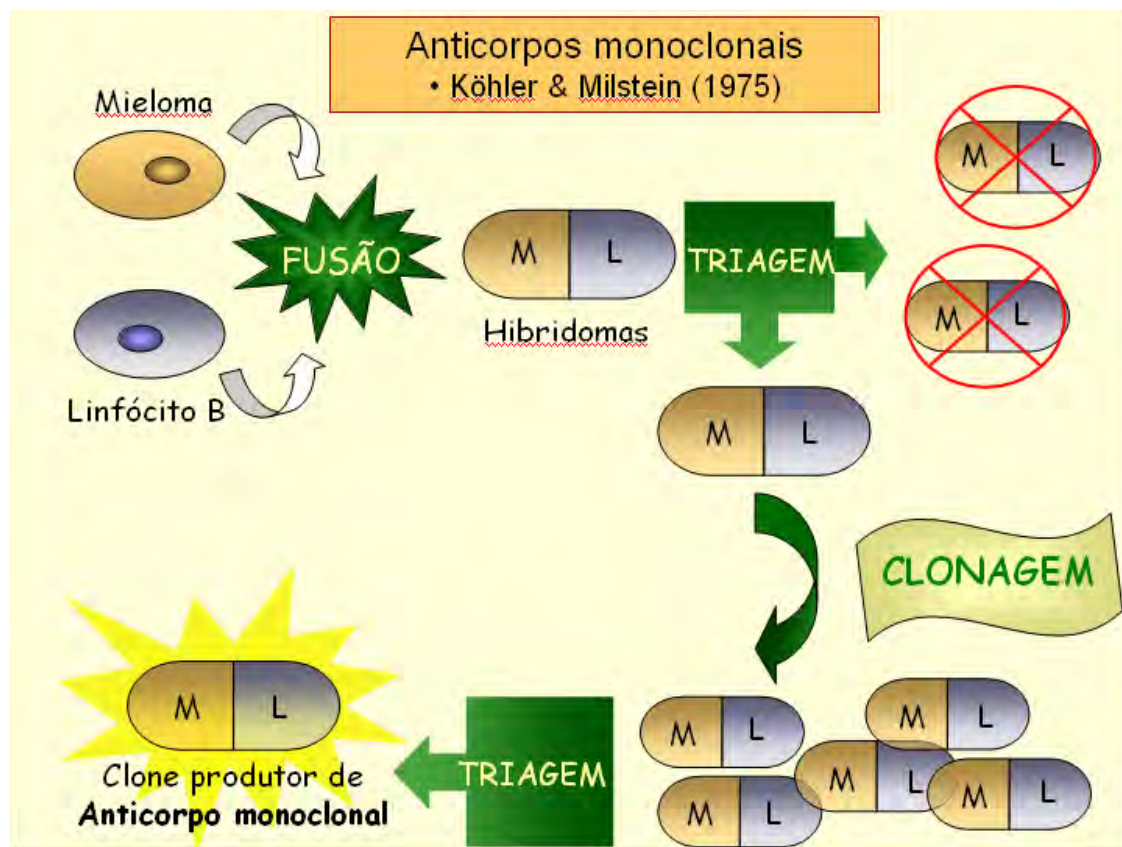


FIGURA 2 – Ilustração do processo de fusão celular, formação de hibridomas e clones produtores de anticorpo monoclonal.

Após a primeira etapa de triagem os hibridomas secretores de anticorpos monoclonais são re-testados pelo menos 3 vezes para garantir a estabilidade da célula recém-construída. Mantendo-se com reatividade contra o antígeno escolhido, a célula é submetida à clonagem celular. Esta etapa é novamente procedida de triagens subseqüentes para então estabelecer-se a fase de amplificação clonal. A amplificação clonal pode ser feita por métodos em cultura como “batch de cultura” (cultura descontínua) em frascos de tamanhos progressivamente maiores chegando a 1 litro e até bio-reator ou pelo método *in vivo*, com a produção de líquido ascítico (HARLOW & LANE, 1988).

O líquido ascítico, também denominado ascite, é um fluido intraperitoneal extraído de camundongos que desenvolveram um tumor peritoneal. O tumor é induzido através da injeção de hibridomas no peritônio, que funciona como uma câmara de crescimento para essas células. Esse método possibilita o crescimento dos hibridomas para altas densidades e sua secreção de anticorpo é mantida. Deste modo, forma-se uma solução com alta concentração de anticorpos, que pode variar de 1 a 10mg/mL, e pode ser coletada (HARLOW & LANE, 1988). A produção de líquido ascítico é o método de escolha para obtenção de anticorpos monoclonais em maiores concentrações por diversas razões, entre elas o fácil desempenho da técnica, proporciona alta concentração de AcMm e elevada taxa de sucesso além de baixo custo por mg de AcMm produzido. Apesar da alta relevância, sabe-se que a indução de ascite pode causar dor e sofrimento aos animais, motivo pelo qual se costuma reduzir o número de animais utilizados (GEUS & HENDRIKSEN, 1998).

Várias pesquisas utilizando anticorpos monoclonais para diagnóstico da cisticercose têm sido realizadas com sucesso para a detecção de antígenos de *T. saginata* em bovinos (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992; DRAELANTS et al., 1995; ONYANGO-ABUJE et al., 1996a.; VAN KERCKHOVEN et al., 1998; DORNY, et al., 2000; 2002; WANZALA et al., 2007).

Harrison et al. (1989) desenvolveram um teste de ELISA utilizando anticorpo monoclonal (Ag-ELISA) capaz de detectar cisticercos viáveis de *T. saginata* no soro de bovinos experimentalmente infectados sem que os cisticercos mortos ou degenerados fossem detectados (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a). Em alguns estudos, constatou-se que a detecção de antígenos pelo método ELISA é 2-10 vezes mais sensível que a inspeção de carne de rotina, podendo ser recomendada para avaliações epidemiológicas (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a, b; DORNY et al., 2000).

Van Kerckhoven et al. (1998) obtiveram sucesso ao utilizar AcMm de isotipo IgG em teste de ELISA na tentativa de melhorar a sensibilidade e

especificidade da detecção de antígenos circulantes de *T. saginata*, mostrando que os AcMm de isotipo IgG possuem maior afinidade com os antígenos em relação aos de isotipo IgM.

Brandt et al. (1992) relataram a capacidade de reconhecimento dos anticorpos monoclonais frente às outras espécies de *Taenia*, sugerindo que alguns epitopos são semelhantes entre as diferentes espécies. Os AcMm produzidos na pesquisa contra produtos de secreção-excreção de *T. saginata* foram capazes de detectar antígenos circulantes em suínos e ovelhas respectivamente infectados com *Taenia solium* e *Taenia ovis* e em amostras de soro de humanos comprovadamente com cisticercose por *Taenia solium* (BRANDT et al., 1992).

Devido a essa característica, em alguns trabalhos foram utilizados antígenos heterólogos para a detecção anticorpos como a aplicação de antígenos de *Taenia crassiceps* para a detecção de pacientes com neurocisticercose (VAZ et al., 1997) ou de cisticercose em suínos (BIONDI et al., 1996; ARRUDA PINTO et al., 2000).

Formas metacestóides de *T. saginata* foram utilizadas como fonte de antígenos para o diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana em imunofluorescência indireta, ELISA e *Western blotting*, em comparação com antígenos de *Taenia solium* (OLIVEIRA et al., 2007). Os pesquisadores concluíram que o antígeno heterólogo pode ser utilizado como alternativa para o diagnóstico da neurocisticercose, já que em todos os testes não houve diferença estatisticamente significativa de especificidade e sensibilidade entre os dois antígenos testados. Entretanto, quando Monteiro et al. (2006) realizaram o teste de ELISA para o diagnóstico da cisticercose bovina utilizando antígenos de *Taenia solium* e de *T. crassiceps*, o teste foi útil para a diferenciação entre a cisticercose e outras doenças, porém apresentou-se deficiente para a detecção de animais naturalmente infectados, por apresentarem discreto grau de infestação.

Algumas frações antigênicas têm sido descritas como importantes na diferenciação de animais positivos e negativos como as frações peso molecular entre 155-220kDa e de 30, 43 e 55kDa que foram identificadas por anticorpos monoclonais denominados HP10 e descritos por Harrison et al. (1989). Joshua et al. (1990) analisaram a antigenicidade de proteínas de fluido vesicular de cisticercos de *T. saginata* de 4, 8, 12 e 16 semanas após infecção experimental de bovinos com ovos do parasita e observaram a existência de proteínas com peso molecular de 12, 14, 16 e 20kDa em todos os fluidos vesiculares estudados e, portanto, mínima variação na composição protéica do fluido que o parasita desenvolve com a maturidade. Outras frações também foram reconhecidas, como as de 43, 72 e 185kDa, mas em menor frequência.

Todas as proteínas citadas sofreram precipitação por soro de bovinos infectados experimentalmente por *T. saginata* com 8 semanas pós-infecção, indicando o potencial diagnóstico desse grupo de proteínas. Tal resultado caracteriza o fluido vesicular de *T. saginata* como uma fonte de material antigênico indicado para uso em imunoenaios. Além dessa conclusão, os pesquisadores observaram a existência de uma proteína de 67kDa aparentemente não imunogênica, sendo provavelmente soroalbumina bovina, já que se sabia que os cisticercos de *T. saginata* acumulam essa proteína no fluido cístico (KAMANGO-SOLLO et al., 1985; MACHNICKA & GRZYBOWSKI, 1986).

Os AcMm 12G5 e 2H8 descritos por Brandt et al. (1992) reagiram com os componentes antigênicos de extrato de *T. saginata* adulta de peso molecular entre 87 e 100kDa e produtos de secreção-excreção de 65kDa.

Objetivos

3. OBJETIVO GERAL

No presente trabalho objetivou-se a produção e caracterização de anticorpos monoclonais dirigidos contra extratos antigênicos de formas metacestóides de *Taenia saginata* que possam ser úteis para o desenvolvimento de testes diagnósticos aplicáveis à detecção de antígenos circulantes em bovinos naturalmente infectados por *T. saginata*.

3.1 Objetivos Específicos

- Produzir hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos das formas metacestóides de *T. saginata*.
- Obter clones secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos das formas metacestóides de *T. saginata*.
- Determinar classe e subclasse dos anticorpos obtidos.
- Caracterizar imunoquimicamente os anticorpos obtidos.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa obteve a aprovação da Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP- campus Botucatu, com protocolo nº 50/2007-CEEA (Anexo 1).

As etapas iniciais da pesquisa abrangeram a obtenção das formas metacestóides de *T. saginata*, produção dos extratos antigênicos, produção de anticorpos policlonais para, em seguida, iniciarem-se as etapas da produção dos anticorpos monoclonais.

4.1 Obtenção dos Extratos Antigênicos

Foram selecionados bovinos que apresentassem formas metacestóides de *T. saginata* em seu organismo, pesquisados através de exame *post-mortem* realizado pelos SIF 2960 (Lençóis Paulista) e SIF 1885 (Guararapes) de acordo com as normas contidas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1980). Os cistos foram retirados de músculos dos bovinos abatidos, portadores de infecção natural (Figura 3).

Os parasitos foram retirados das fibras musculares, sob refrigeração, tomando-se o cuidado de remover todo o tecido conjuntivo aderido aos cisticercos. Após várias lavagens com solução salina (NaCl 0,15M) realizou-se conservação a - 20°C, em presença de inibidor de proteases (25mM PMSF).



FIGURA 3 - Detalhe do tecido muscular bovino contendo a forma metacestóide de *Taenia saginata*.

4.1.1 Obtenção do extrato antigênico total

O extrato total foi obtido segundo o protocolo de Montenegro et al. (1996) com modificações: após o descongelamento dos cistos conservados a -20°C , adicionou-se solução salina ($\text{NaCl } 0,15\text{M}$) para o processamento em homogeneizador de Potter a 4°C . Em seguida, submeteu-se o material processado a 5 ciclos de sonicação a 20KHz , 4°C , durante 1 minuto, com 1 minuto de descanso entre os ciclos, seguido de adição de 10% do volume de PMSF ($0,25\text{mM}$).

O volume total obtido foi centrifugado a $15.000 \times g$, por 30 minutos, a 4°C e o sobrenadante novamente centrifugado por 60 minutos. Em seguida, o sobrenadante final foi aliquoteado e mantido a -80°C .

4.1.2 Obtenção do extrato antigênico de fluido vesicular

O processamento do extrato antigênico de fluido vesicular foi realizado segundo Vaz et al. (1997), com modificações. Resumidamente, os cistos conservados a -20°C foram descongelados, perfurados manualmente com agulha estéril e centrifugados a $15.000 \times g$, por 60 min, a 4°C . A seguir, adicionou-se 10% do volume de inibidor de proteases (PMSF $0,25 \text{ mM}$), e centrifugou-se novamente a $15.000 \times g$, por 30 min, a 4°C . O sobrenadante obtido foi aliquoteado e mantido a -80°C .

4.2 Determinação da concentração protéica

Determinou-se a concentração protéica total dos extratos antigênicos com a utilização do método colorimétrico do ácido bicinconínico (kit BCA Protein Assay), segundo as instruções do fabricante (Pierce® - cód. 23225). O kit possibilita a comparação dos valores de densidade óptica das amostras com os obtidos para albumina (padrão).

4.3 Produção de anti-soro policlonal específico

Para a produção do anti-soro policlonal contra os dois extratos antigênicos de *T. saginata* foram utilizados 04 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, com cerca de 50 dias de vida. A manutenção destes animais ocorreu no Infectório do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, campus Araçatuba, em gaiolas individuais, com sala climatizada mantida por meio de ar-condicionado e exaustão, e temperatura programada para 22°C.

Os coelhos receberam 4 doses de inóculo contendo 1000µg de cada extrato antigênico, como descrito no Quadro 2. Para a coleta de sangue, via intracardíaca, os animais foram anestesiados por meio de aplicação endovenosa de tiopental sódico, na dose de 20 a 30 mg/Kg de peso. Após a coleta, os animais foram eutanasiados com aplicação endovenosa do mesmo anestésico, na dose total de 40 a 50 mg/Kg de peso. Amostras coletadas da veia auricular dos coelhos antes da imunização foram utilizadas como controle negativo.

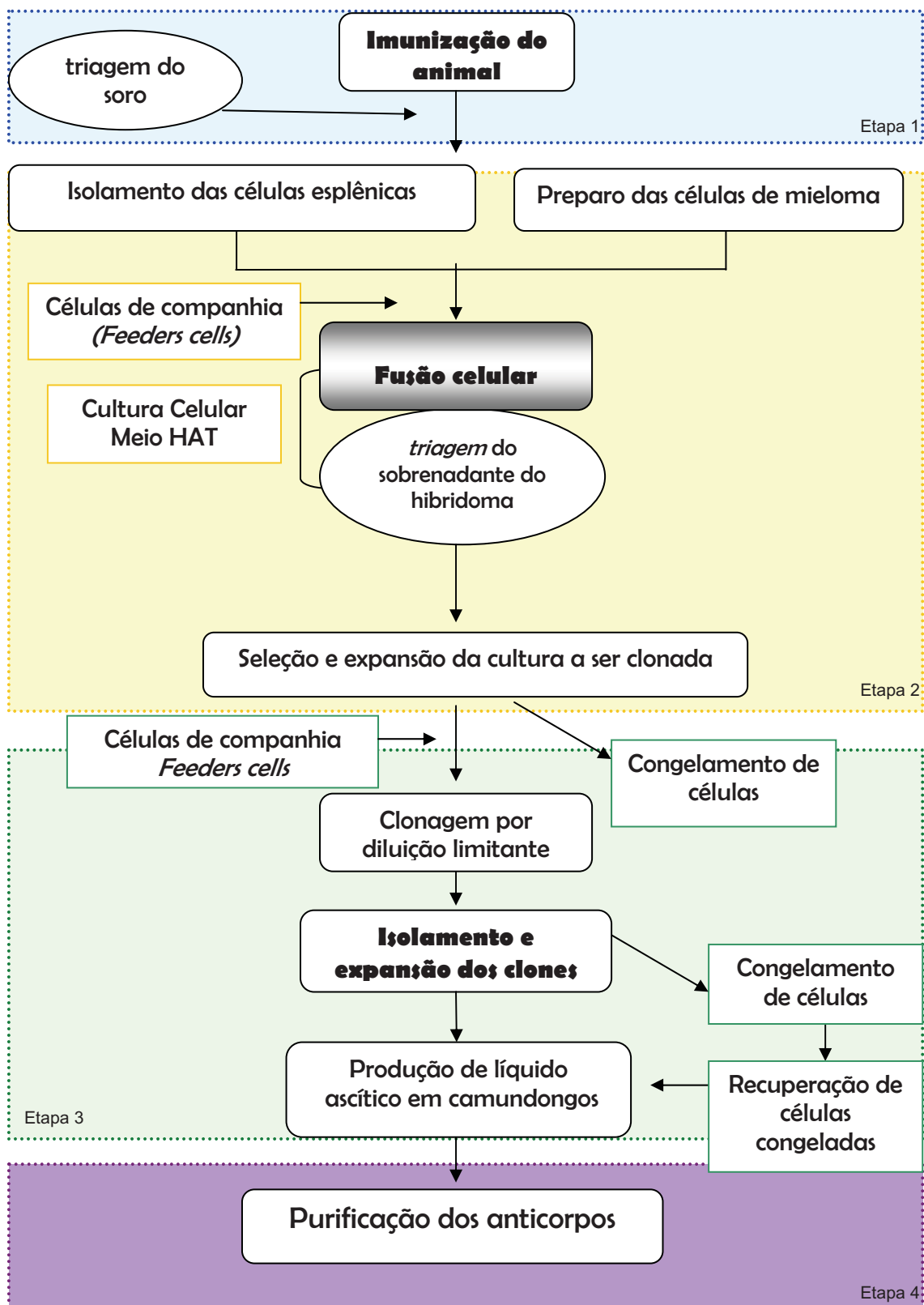
QUADRO 2. Agenda de imunização para produção de soro hiperimune em coelhos.

Coelhos	Inóculo	Agenda de Imunização	Via de Inoculação	Adjuvante
1 e 2	fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i>	Dia 0	SC (subcutânea)	Completo de Freund
		Dia 14		Incompleto de Freund
		Dia 21 Dia 30		
3 e 4	Extrato total de <i>Taenia saginata</i>	Dia 0	SC (subcutânea)	Completo de Freund
		Dia 14		Incompleto de Freund
		Dia 21 Dia 30		

4.4 Produção dos Anticorpos Monoclonais murinos

A produção dos anticorpos monoclonais envolve 4 etapas identificadas no fluxograma a seguir.

Fluxograma das diferentes etapas de Obtenção de Anticorpos Monoclonais



4.4.1 Imunização

Foram utilizados camundongos de linhagem isogênica BALB/c, mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina da UNESP - campus Botucatu, em sala climatizada por meio de ar-condicionado e exaustão além de temperatura programada para 22⁰C, visando o bem-estar dos animais.

Denominou-se TAEB e TAEF os protocolos em que se utilizou, respectivamente, o extrato total e o extrato de fluido vesicular de *T. saginata* como imunógeno. Em cada protocolo foram imunizados 5 camundongos como descrito no Quadro 3, sendo que todos, dentro de cada protocolo, receberam a mesma fonte de antígeno na dose de 50µg/animal e o adjuvante de imunização foi sulfato potássico de alumínio dodecahidrato [KAl(SO₄)₂.12H₂O]. Foram utilizadas duas vias diferentes de imunização: via intraperitoneal (IP) e endovenosa (EV) com inoculação do antígeno pela veia caudal.

QUADRO 3 - Protocolo de imunização em camundongos BALB/c com extrato total e fluido vesicular de *Taenia saginata*.

Protocolo de imunização	Antígeno	Nº de animais	Agenda de imunização	Via de inoculação	Adjuvante
TAEB	Extrato total de <i>Taenia saginata</i>	5	D0 – 1ª imuniz.	IP	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O
			D21 – 2ª imuniz.	IP	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O
			D42 – reforço	EV	-
TAEF	Fluido vesicular de <i>Taenia saginata</i>	5	D0 – 1ª imuniz.	IP	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O
			D21 – 2ª imuniz.	IP	KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O
			D42 – reforço	EV	-

4.4.2 Células de fusão

Como parceiras de fusão foram utilizadas as células de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidas por Köhler e Milstein (1975), provenientes do *Laboratoire de Genie D`Institute National de Transfusion Sangüine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido (DEFFUNE et al., 1996).

As células NS/1 foram descongeladas 8 dias antes da fusão segundo Deffune (1992) e mantidas em crescimento com meio de cultura, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Acompanhou-se o crescimento das células até que elas apresentassem viabilidade celular igual ou superior a 90%,

verificada por coloração azul de tripano (*Trypan Blue* 0,4%) em microscópio óptico.

4.4.3 Fusão Celular

As fusões celulares foram realizadas segundo a técnica descrita por Köhler & Milstein (1975) com modificações de Deffune (1992).

Após as duas primeiras imunizações realizadas com intervalo de 21 dias, os animais receberam um reforço final por via intravenosa (21 dias após a segunda imunização), sem adjuvante, três dias antes da fusão. No dia da fusão, os camundongos foram anestesiados com anestésico tiopental sódico para a esplenectomia e, em seguida, eutanasiados com o mesmo fármaco na dose de 60-80mg/kg de peso animal (IP). Cada baço retirado foi manipulado separadamente em capela de fluxo laminar para a perfuração da cápsula esplênica e remoção dos linfócitos.

O procedimento de fusão foi realizado por co-centrifugação dos linfócitos recém-coletados de cada animal imunizado juntamente com células NS/1 na proporção de 1/10 e o agente fusionante polietilenoglicol PM 4000 (PEG) (1mg de PEG para cada 100×10^6 células - NS1 + linfócitos). Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas de cultura celular de 96 cavidades, contendo meio enriquecido (ME) em aminoácidos essenciais e não essenciais, e soro fetal bovino (SFB) a 20%.

A seleção enzimática dos híbridos foi realizada dentro do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT) (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) pela utilização do meio seletivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) a partir do dia seguinte à fusão. Este meio possibilita a seleção através da proliferação dos hibridomas (linfócito B + NS/1) e a eliminação das células não fusionadas.

Três dias após a fusão, foram adicionadas à cultura dos hibridomas as células de companhia (*feeders cells*), células oriundas de timo de camundongo de até 20 dias de vida, na quantidade de 1×10^5 células por cavidade da placa. A finalidade é suplementar o meio de cultura com fatores de crescimento, importantes para o desenvolvimento dos híbridos recém construídos (GORDON, 1988; DAVIS, 1994). Além disso, os timócitos facilitam a visualização do crescimento dos hibridomas por possuírem tamanho bem menor.

4.4.4 Seleção dos hibridomas (Triagem)

A partir da fusão, a observação em microscópio invertido permitiu o monitoramento diário das células. As cavidades onde houve proliferação celular e confluência de 95 a 100% foram marcadas para a coleta dos sobrenadantes de cultura (SNC). Todos os SNC foram coletados no dia do teste, quando houvesse passado no mínimo 48 horas sem troca de meio de cultura, favorecendo o aumento da concentração de imunoglobulinas.

Os SNC coletados foram testados por ELISA indireto (Figura 4) para determinar a presença de anticorpos específicos contra os antígenos utilizados na imunização dos camundongos. Os extratos total e fluido vesicular de *T. saginata* foram fixados nas microplacas de fundo chato na concentração de $10\mu\text{g/mL}$ em tampão carbonato-bicarbonato ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 0,2M, pH 9,6) por 1 hora a 37°C e, em seguida, a 4°C por 12 horas. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com blotto (PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl - pH 7.4 + 5% de leite em pó desnatado).

Os SNC das células obtidas ($100\mu\text{L}$) foram aplicados na placa de ELISA, assim como os anti-soros de coelho produzido neste trabalho e o meio de cultura estéril, respectivamente, controle positivo e negativo da reação. O anticorpo secundário escolhido para detectar os anticorpos murinos foi IgG de cabra polivalente anti-IgG/ IgM/ IgA de camundongo (1/8.000) e para o controle positivo IgG de cabra anti-IgG de coelho (1/1.000), ambos conjugados a

peroxidase, diluídos em blotto. A solução cromógena empregada foi o TMB (3,3',5,5'- tetrametilbenzidina, Abbot®) gentilmente cedida pelo Laboratório de Sorologia do Hemocentro (FMB de Botucatu). A medida da intensidade da reação foi realizada por análise espectrofotométrica em aparelho leitor de microplacas, com filtro de 450nm. Entre as etapas foram realizadas lavagens com PBS pH 7.4 (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl) adicionado de 0,1% Tween 20.

As células cujos sobrenadantes apresentaram-se reagentes frente ao antígeno, foram expandidas para volumes crescentes de meio de cultura e os respectivos sobrenadantes testados por mais três vezes por ELISA indireto. Aquelas que se mantiveram reagentes até a quarta triagem foram clonadas.



FIGURA 4 – Esquemática do teste ELISA indireto

Em função das densidades óticas obtidas, os SNC reagentes foram classificados em baixa, média e alta reatividade. Os critérios para esta classificação são apresentados no Quadro 4.

QUADRO 4 - Caracterização da reatividade segundo a densidade ótica

Caracterização da reatividade	Critério
Baixa reatividade	D.O do teste: 3 x D.O. do controle negativo
Média reatividade	D.O do teste: > 3 x e < 10 x D.O. do controle negativo
Alta reatividade	D.O do teste: > 10 x D.O. do controle negativo

4.4.5 Expansão dos híbridos em cultura

Os híbridos selecionados na primeira triagem foram expandidos conforme preenchiam as cavidades da microplaca de cultura de 96 poços. Assim, as células foram repicadas para placas de 24 poços e, posteriormente, para frascos de cultura de 25cm², ao mesmo tempo em que as triagens subsequentes eram realizadas. Então, as células que mantiveram a reatividade até o quarto teste foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de imersão em nitrogênio líquido para assegurar sua conservação, segundo Deffune et al. (1996).

Após o congelamento em 6 ampolas, cada híbrido foi semeado em frascos de cultura de 25cm² para expansão denominada “*batch* de cultura”, em que o material permanece em cultivo por um período de 8 dias sem troca de meio de cultura, conseguindo-se assim, maior liberação de anticorpos. As células em apoptose separadas por centrifugação foram desprezadas e o sobrenadante de cultura congelado em tubos devidamente identificados para posterior análise.

4.4.6 Viabilidade celular

Para garantir o sucesso da clonagem celular, foi realizada a estimativa de viabilidade dos hibridomas pela coloração Azul de Tripan a 0,4%. Em

microscopia óptica as células vivas aparecem claras e brilhantes, pois a membrana plasmática íntegra exclui o corante. As células mortas ou em degeneração, ao contrário, incorporam o corante e aparecem maiores e com coloração azulada, devido à fragmentação da membrana plasmática. Assim, o resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis, segundo a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ células vivas} + \text{n}^{\circ} \text{ células mortas}}$$

4.4.7 Clonagem

A clonagem dos hibridomas positivos foi realizada pelo método de diluição limitante em microplaca (HARLOW & LANE, 1988) com timócitos obtidos de camundongos BALB/c de 15 a 20 dias de idade como células de companhia. A finalidade da clonagem é garantir que haja uma única célula (hibridoma) em cada poço da placa de cultura. Através da observação por microscopia invertida, cada poço foi identificado sob a condição de clone único ou múltiplo, sendo que somente os clones oriundos de poços denominados únicos foram considerados potenciais monoclonais.

Os clones que se desenvolveram foram testados por ELISA indireto, segundo o protocolo anteriormente descrito, e aqueles que obtiveram alta reatividade foram expandidos em volumes crescentes de meio de cultura até que alcançassem densidade adequada para congelamento e para inoculação em camundongos visando a produção de ascite. As células foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de DMSO a 4°C, seguido de congelamento em nitrogênio líquido.

4.4.8 Determinação da classe das imunoglobulinas produzidas

A técnica de citometria de fluxo foi realizada para determinação da classe e sub-classe das imunoglobulinas murinas produzidas (BROW et al.,

1995; HAYDEN et al., 1988), através do kit CBA Flex - IgA, IgG e IgM (BD Biosciences[®]), utilizado de acordo com as instruções do fabricante.

Conjugated beads to antibody (CBA) é um kit utilizado para identificação rápida do isotipos de cadeia pesada e leve de um anticorpo monoclonal murino em uma única amostra. Cada esfera (bead) prevê uma superfície de captura para uma proteína específica. Para a determinação do isotipo, anticorpos reveladores com intensidade de fluorescência diferentes para cada isotipo são colocados após incubação das beads com a amostra (sobrenadante de cultura). O kit aliado à citometria de fluxo permite volume de amostra pequena, poucas diluições e rápida execução da técnica. Este produto possibilita a detecção de mais de uma classe e/ou subclasse na mesma amostra (MORGAN et al., 2004).

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo provido de laser de argônio a 480nm, de 15mW, e as informações obtidas foram analisadas pelo *software Cell Quest - BD[®]* por gráficos em “dot plot” para análise.

4.4.9 Obtenção de anticorpos monoclonais por produção de líquido ascítico

Para a obtenção de anticorpos monoclonais em maior concentração que em sobrenadante de cultura, decidiu-se pela produção de líquido ascítico. Para tal, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com cerca de 60 dias de vida, provenientes do biotério da FMB – UNESP e mantidos nas mesmas condições anteriormente descritas.

Suspensões de clones produtores foram injetadas na cavidade peritoneal dos camundongos previamente tratados com 1,0mL de Pristane[®]. Após 10 a 15 dias da injeção das células, com o intumescimento do abdômen dos animais, o líquido ascítico foi puncionado utilizando-se seringas e agulhas estéreis. As células e a gordura foram removidas após centrifugação a 25.000 x g por 30 minutos, e o líquido ascítico aliquotado em ampolas, congelado e conservado a - 80°C.

4.4.10 Avaliação eletroforética da monoclonalidade

O controle eletroforético da monoclonalidade foi realizado a partir do líquido ascítico obtido e anticorpo monoclonal purificado. Foi realizada a eletroforese sobre lâminas de vidro em gel de ágar a 1%, de acordo com o protocolo operacional padrão desenvolvido no Laboratório de Bioquímica do Hemocentro da FMB. As lâminas de vidro numeradas foram cobertas por gel de ágar a 1% diluído em tampão Veronal (pH 8.9) e, após secagem, foram formadas finas canaletas de 1,2cm de comprimento. Em cada lâmina de vidro foi aplicada 5µL da amostra. As lâminas foram dispostas na cuba de eletroforese, aplicando-se 80mA e 180 V durante 60 minutos. Após a corrida eletroforética as lâminas foram deixadas em solução contendo álcool, ácido acético e água (70% de álcool, 5% de ácido acético e 25% de água) durante 20 minutos para fixação, cobertas por papel filtro e deixadas em estufa a 37°C por 12 horas para secagem. Para evidenciar a separação das proteínas, utilizou-se o corante negro de amido e a leitura em scanner com o software SDS-60 para eletroforese (CELM®).

4.4.11 Purificação dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais foram purificados a partir de líquido ascítico por cromatografia de afinidade. O aparelho AKTA Prime (GE Healthcare®) realiza a purificação através da passagem da amostra por colunas que possuem afinidade pela imunoglobulina de interesse, permitindo a eluição da mesma no final do processo.

Para purificar as imunoglobulinas de classe IgM utilizou-se a coluna Hi Trap IgM (GE Healthcare®) e para classe IgG a coluna Hi Trap rprotein A (GE Healthcare®).

4.5 Caracterização das frações antigênicas dos extratos obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a identificação das frações antigênicas presentes nos 2 extratos produzidos, realizou-se a separação em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 9 cm x 8 cm e 0,75 mm de espessura, com gel de separação de gradiente 7,5 a 20% e empilhamento de 5% (LAEMMLI, 1970), em tampão Tris/Glicina. O extrato antigênico foi diluído em tampão de amostra 5 vezes concentrado contendo 2-Mercaptoetanol (1M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol e 50% glicerol) e aquecido a 100°C por 3 minutos. Foram aplicados 50µg de extrato por canaleta e a corrida efetuada em voltagem constante, com 50 volts no gel de empilhamento e 70V no gel de separação. Um padrão de peso molecular (Sigma® - S8445) foi incluído para facilitar a identificação.

Finalizada a corrida, o gel foi deixado sob agitação em solução corante de Azul de Coomassie por 1 hora e, em seguida, descorado e fotografado.

4.6 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por *Western Blotting*

A separação das frações protéicas dos extratos antigênicos foi realizada em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de 9 cm x 8 cm e 0,75 mm de espessura, com gel de separação 12% e empilhamento de 5% (LAEMMLI, 1970). As condições de corrida e concentração das amostras são semelhantes às já descritas anteriormente.

As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad® - 0,45 m), em sistema semi-seco (Biorad Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell), empregando-se um potencial de 10V, por 40 minutos, em tampão 25mM Tris/Glicina/Metanol, a 4°C (TOWBIN et al., 1979).

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 18 horas com tampão PBS (0,01M PO_4^{--} /0,15M NaCl, pH 7,2) acrescido de 5% de leite em pó desnatado (blotto 5%) e incubadas, por 18 horas, com os AcMm. Seguiu-se à reação com anticorpo anti-IgG/A/M de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma[®]) diluído 1:1.000 em blotto 5% por 90 minutos, à temperatura ambiente. O substrato utilizado foi a solução de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato/ Nitroblue Tetrazolium (BCIP/NBT). Entre as diferentes fases, as tiras foram lavadas com blotto 5%, com exceção das lavagens posteriores à adição do anticorpo conjugado em que se utilizou blotto 1%.

Os sobrenadantes de cultura testados não sofreram diluição, enquanto que os líquidos ascíticos foram diluídos 1:10 em blotto 5% e os soros de bovino e coelho diluídos a 1:100 em blotto 5%. Para as tiras de membrana incubadas com soro de bovino e coelho procedeu-se a reação com anticorpo anti-IgG bovino conjugado à peroxidase (Sigma[®]) e anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (Sigma[®]), respectivamente. Os substratos utilizados foram 5-Bromo-4-Cloro-3-IndolilFosfato/ Nitroblue Tetrazolium (BCIP/NBT - Sigma[®]) e 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB - Sigma[®]).

4.7 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonas por imunofluorescência indireta

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados segundo Yang & Chung (2004), com modificações. Os metacestóides presentes na musculatura de bovinos com infecção natural foram fixados em formol tamponado a 10%, por 48 horas. Em seguida, foram envoltos por paraplast[®] e cortados em fatias com 5µm de espessura. As lâminas contendo os cortes do metacestóide foram submetidas à temperatura de 55°C, em estufa, por quatro horas, para retirada do paraplast[®] com subseqüentes incubações em xilol e álcool em diferentes concentrações.

Os cortes foram incubados com soro eqüino a 4% para bloqueio de sítios inespecíficos por 30 minutos e, posteriormente, com as ascites por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a incubação, seguiu-se a adição de

anticorpo anti-camundongo polivalente conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma® - F1010) diluído 1:50, por 30 minutos, no escuro. Entre todas as etapas e ao final do processo foram realizadas duas lavagens com PBS (Figura 5). Os cortes foram observados em microscópio de fluorescência, com adição de glicerina tamponada.

Após a reação de imunofluorescência indireta, os mesmos cortes foram submetidos a duas lavagens com PBS e corados com Hematoxilina-Eosina.

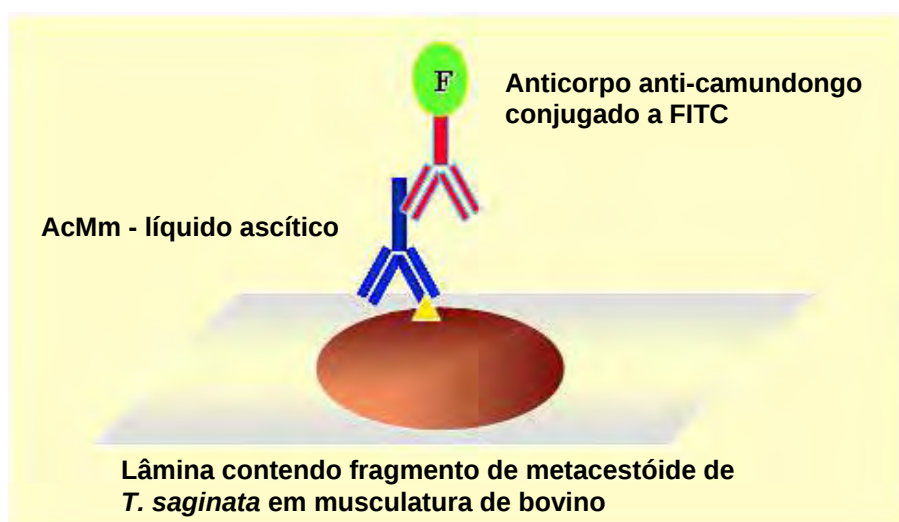


FIGURA 5: Esquematização da técnica de Imunofluorescência indireta (IFI).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração protéica dos extratos antigênicos

A Tabela 1 apresenta os resultados da concentração protéica (mg/mL) dos dois extratos antigênicos realizados pelo método do ácido bicinconínico (BCA).

TABELA 1 - Concentração protéica e volume obtido dos extratos antigênicos de *Taenia saginata*.

Extrato antigênico	Volume (mL)	Proteínas totais (mg/mL)
TAEB	4,9	7,0
TAEF	2,2	15,6

5.2 Anti-soro policlonal específico

Cerca de 15mL de soro policlonal dos coelhos 1, 3 e 4 foram obtidos sendo que o coelho 2 veio a óbito após a terceira imunização.

5.3 Obtenção de anticorpos monoclonais

Utilizaram-se 05 camundongos da linhagem BALB/c para os protocolos de imunização anteriormente descritos. Foram realizadas nove fusões celulares a partir de dois protocolos de imunização diferentes:

- Protocolo **TAEB** – extrato total de *T. saginata*
- Protocolo **TAEF** – fluido vesicular de *T. saginata*

Para cada protocolo foram imunizados 05 camundongos BALB/c, sendo que todos os animais do protocolo TAEB permaneceram vivos até o dia da fusão. Entretanto, no protocolo TAEF 01 animal morreu após receber a última injeção de extrato antigênico impedindo o procedimento de fusão para o mesmo.

Para o protocolo TAEB foram obtidos 3.428 híbridos dos quais 839 desenvolveram-se sem a predominância de células indesejáveis (células com vacúolos, fibroblastos) (Tabela 2). A média percentual de testes por protocolo TAEB variou de 14,3% a 36,9%.

Para o protocolo TAEF, foram obtidos 2.802 híbridos dos quais 838 foram testados. Na Tabela 3 são apresentados os dados relativos às fusões dos quatro animais do protocolo TAEF, bem como a porcentagem de híbridos testados. Neste caso, a média de testes em porcentagem variou de 20,9% a 37,0%.

TABELA 2 - Híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato total de *Taenia saginata* (TAEB), segundo o rendimento.

FUSÃO	Nº placas de 96 poços	Nº de híbridos distribuídos	Nº de híbridos testados	% de híbridos testados
TAEB 1	10	958	137	14,3
TAEB 2	8	748	156	20,9
TAEB 3	6	574	200	34,8
TAEB 4	6	574	212	36,9
TAEB 5	6	574	134	23,3
TOTAL	36	3.428	839	$\bar{X} = 26,0$

TABELA 3 - Híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* (TAEF), segundo o rendimento.

FUSÃO	Nº placas de 96 poços	Nº de híbridos distribuídos	Nº de híbridos testados	% de híbridos testados
TAEF 1	6	574	120	20,9
TAEF 2	9	814	301	37,0
TAEF 3	8	766	251	32,8
TAEF 4	7	648	166	25,6
TOTAL	30	2.802	838	$\bar{X}$ =29,1

5.3.1 Triagem

Três dias após a fusão, iniciou-se a observação das placas de cultura para identificação dos híbridos que se desenvolveram. Decidiu-se por utilizar a técnica de ELISA indireto para a triagem, método imunoenzimático no qual os resultados são expressos em densidade óptica (DO), com a sensibilização das placas de ELISA com o respectivo antígeno em que foi feita a imunização (TAEB e TAEF).

Após o primeiro teste de ELISA indireto, dos 839 híbridos testados no protocolo TAEB, identificaram-se 283 híbridos cujo desempenho no teste ELISA mostrou-se reagente. Para o protocolo TAEF, partindo de 838 híbridos testados, obtiveram-se 85 híbridos reagentes.

Os híbridos selecionados foram expandidos por passagens celulares (repicagem) e submetidos a um segundo, terceiro e quarto testes. Esta sequência de testes se faz necessária para a avaliação dos híbridos estáveis, ou seja, aqueles que apesar de muitas divisões celulares mantêm sua capacidade secretora. Desta forma, o desempenho dos testes foi de 52, 30 e 10 híbridos reagentes para o protocolo TAEB (no 2º, 3º e 4º re-testes,

respectivamente) e 60, 10 e 09 híbridos reagentes para o protocolo TAEF. (Tabelas 4 e 5).

TABELA 4 - Número de híbridos selecionados nos quatro testes de ELISA indireto para o protocolo de imunização dos camundongos com o extrato total de *Taenia saginata* (TAEB).

Fusão	Nº híbridos testados	Nº híbridos reagentes no 1º teste	Nº híbridos reagentes no 2º teste	Nº híbridos reagentes no 3º teste	Nº híbridos reagentes no 4º teste
TAEB 1	137	77	12	7	3
TAEB 2	156	47	3	3	1
TAEB 3	200	66	2	2	1
TAEB 4	212	59	13	6	3
TAEB 5	134	34	22	12	2
TOTAL	839	283	52	30	10

TABELA 5 - Número de híbridos selecionados nos quatro testes ELISA indireto para o protocolo de imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* (TAEF).

Fusão	Nº híbridos testados	Nº híbridos reagentes no 1º teste	Nº híbridos reagentes no 2º teste	Nº híbridos reagentes no 3º teste	Nº híbridos reagentes no 4º teste
TAEF 1	120	04	01	01	01
TAEF 2	301	29	21	05	05
TAEF 3	251	46	32	02	02
TAEF 4	166	06	06	02	01
TOTAL	838	85	60	10	09

A partir dos resultados obtidos na última triagem, os híbridos foram separados em 3 grupos de acordo com a reatividade da capacidade secretora apresentada por cada híbrido frente ao antígeno, eles foram denominados com

baixa, média e alta reatividade. As Tabelas 6 e 7 apresentam as faixas de densidade ópticas (DO) compreendidas para os 3 grupos, bem como o número de híbridos positivos nesse teste.

TABELA 6 - Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-extrato total de *T. saginata* no quarto teste de triagem por ELISA indireto.

Fusões	Nº híbridos positivos	Baixa reatividade (até 0.499)	Média reatividade (0.500 >DO>1.000)	Alta reatividade (DO>1.000)
TAEB 1	3	0	0	3
TAEB 2	1	0	0	1
TAEB 3	1	0	0	1
TAEB 4	3	0	1	2
TAEB 5	2	0	0	2
TOTAL	10	0	1	9

TABELA 7 - Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-fluido vesicular de *T. saginata* no quarto teste de triagem por ELISA indireto.

Fusões	Nº híbridos positivos	Baixa reatividade (até 0.499)	Média reatividade (0.500 >DO>1.000)	Alta reatividade (DO>1.000)
TAEF 1	1	1	0	0
TAEF 2	5	3	1	1
TAEF 3	2	0	1	1
TAEF 4	1	1	0	0
TOTAL	9	5	2	2

5.3.2 Expansão dos híbridos em cultura

Após o resultado da segunda triagem os híbridos confirmados como reagentes foram transferidos para placas de 24 cavidades e em seguida para frascos de cultura de 25cm². Ocasionalmente, durante o processo de expansão celular, híbridos selecionados no teste de ELISA indireto não apresentaram crescimento satisfatório e foram eliminados do experimento. Outro fato que resultou na eliminação de híbridos foi a ocorrência de contaminação bacteriana após o terceiro teste de triagem do protocolo TAEB, determinando a extinção de 9 híbridos para efetivo controle da contaminação. Destes, 7 células eram oriundas do mesmo protocolo (TAEB 5) enquanto as outras duas, eram de protocolos diferentes: TAEB 1 e TAEB 2. Os híbridos do protocolo TAEF não apresentaram contaminação nessa etapa, já que os protocolos não foram realizados concomitantemente.

Nesta fase, foram congeladas 6 ampolas de cada híbrido que apresentou expansão satisfatória em cultura e manutenção da reatividade em ELISA indireto. Foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido 10 híbridos do protocolo TAEB e 9 híbridos do protocolo TAEF para a constituição do banco de células.

5.3.3 Clonagem

O procedimento de clonagem visa garantir que a imunoglobulina obtida no final do processo seja oriunda de células de padrão único (Figura 6). Para assegurar uma clonagem eficiente, os híbridos em cultura foram submetidos ao teste de viabilidade. Segundo DAVIS (1994), as células devem apresentar viabilidade igual ou acima de 90% para serem clonadas, entretanto, os valores obtidos foram abaixo, porém próximos a 90% e decidiu-se por realizar a clonagem. Os percentuais de viabilidade, em cada processo de clonagem estão expressos nas Tabelas 8 e 9.

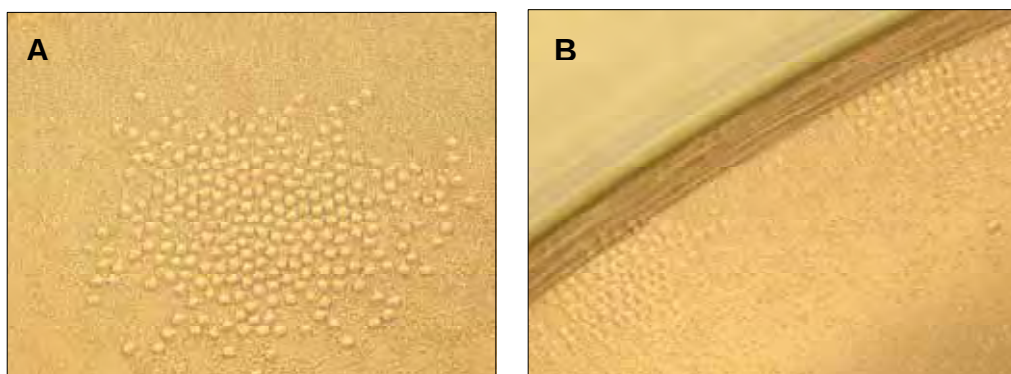


FIGURA 6 - Clones produzidos no experimento. Clones únicos (A), clones múltiplos (B).

Devido ao número elevado de clones produzidos, características das células como taxa de crescimento, ausência de vacuolização e ausência de fibroblastos, bem como os critérios de reatividade no teste de triagem já mencionados, foram critérios de eleição para a escolha de qual clone permaneceria em expansão e constituiria o banco de células definitivo. Decidiu-se por selecionar somente 6 clones pertencentes a cada híbrido os quais foram mantidos em nitrogênio líquido.

Durante o processo de expansão em cultura e os testes de triagem subsequentes, alguns clones perderam a reatividade, o que explica o total de clones retidos para os híbridos TAEB 4 – 56 e TAEB 5 – 31 ficarem abaixo de 6 (Tabela 8).

TABELA 8 - Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato total de *Taenia saginata* (TAEB) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por ELISA indireto.

Híbrido	Viabilidade	Nº clones testados	Nº clones retidos	Nº clones retidos após 3ª triagem
TAEB 1 – 40	87,5%	138	27	6
TAEB 1 – 53	87,8%	93	93	6
TAEB 1 – 97	80,0%	93	93	6
TAEB 2 – 14	57,0%	22	18	6
TAEB 3 – 16	91,3%	93	24	6
TAEB 4 – 56	87,3%	93	9	3
TAEB 4 - 139	83,6%	93	91	6
TAEB 4 -196	55,0%	20	17	6
TAEB 5 – 31	91,0%	93	90	5
TAEB 5 – 88	94,0%	93	93	6
TOTAL	$\bar{X}$ =81,5%	831	555	56

TABELA 9 - Percentual de viabilidade dos híbridos para a produção de anticorpos monoclonais obtidos com a imunização dos camundongos com o extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* (TAEF) no momento da clonagem, segundo o número de clones testados, obtidos e selecionados após triagem por ELISA indireto.

Híbrido	Viabilidade (%)	Nº clones testados	Nº clones obtidos	Nº clones retidos no 3º teste
TAEF 1 – 74	100,0	44	0	0
TAEF 2 - 114	76,0	15	0	0
TAEF 2 - 137	87,0	27	22	6
TAEF 2 - 150	91,0	33	29	6
TAEF 2 - 253	80,0	39	22	6
TAEF 2 - 270	90,0	33	25	6
TAEF 3 - 134	100	32	25	6
TAEF 3 - 226	100	26	24	6
TAEF 4 - 142	81,2	9	7	6
TOTAL	$\bar{X} = 89,5$	258	154	42

Para o protocolo TAEF observou-se que os clones provenientes de dois híbridos (TAEF 1 - 74 e TAEF2 - 114) foram todos negativos no teste de ELISA indireto (Tabela 9). Este fato deve-se, provavelmente, à contaminação das culturas por *Mycoplasma sp.* Assim, foram efetivamente testados 258 clones, e retidos somente 154 que, após três testes de triagem, reduziram-se para 42.

Três dias após a clonagem notou-se a existência de contaminação bacteriana nas placas dos híbridos TAEF e em alguns poços de suas placas de clonagem, que foram desprezadas. Após os três testes de triagem as placas foram acometidas por nova contaminação bacteriana, resultando em novos descartes. Diante dessa dificuldade, a continuidade do processo foi comprometida, culminando com a perda de muitos clones, restando somente 18 em cultura.

5.3.4 Determinação de classe e subclasse das imunoglobulinas pelo método de citometria de fluxo

Todos os clones que produziram sobrenadantes por “*batch* de cultura”, ou seja, 56 clones TAEB e 18 clones TAEF foram avaliados. Para o primeiro protocolo obtiveram-se 18 clones IgG₁, 32 IgM, 1 policlonal (IgM + IgG₁) e 5 negativos. Será novamente realizada a determinação de classe/subclasse dos 5 clones negativos sem a diluição dos SNC, já que esse resultado pode ser devido à baixa concentração de anticorpos contida nos SNC aliado à diluição recomendada pelo fabricante do kit. Do protocolo TAEF obtiveram-se 9 clones IgG₁ e 9 IgM. A Tabela 10 apresenta a classe e subclasse somente dos clones selecionados para produção de líquido ascítico em camundongos.

TABELA 10 - Classe e sub-classe, determinada por citometria de fluxo, dos anticorpos produzidos pelos clones obtidos nos protocolos de imunização com extrato total de *Taenia saginata* (TAEB) e com extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* (TAEF).

Clone	Classe e subclasse
TAEB 1 – 40A3	IgG ₁
TAEB 1 – 53A4	IgM
TAEB 2 – 14A1	IgG ₁
TAEB 2 – 14A2	IgG ₁
TAEB 3 – 16A6	IgM
TAEB 5 – 31A3	IgM
TAEF 2 – 137A1	IgG ₁
TAEF 2 – 137A6	IgG ₁
TAEF 2 – 253A5	IgM
TAEF 2 - 270A2	IgG ₁
TAEF 3 – 134A3	IgG ₁

Na Figura 7 estão representados os gráficos de “*dot plot*” do *software* *Cell Quest* – (BD Bioscience®) do controle negativo, dois controles positivos além da análise de classe e subclasse dos clones TAEB 3 – 16A6, TAEB 1 - 40A3 e TAEB 1 – 40A4.

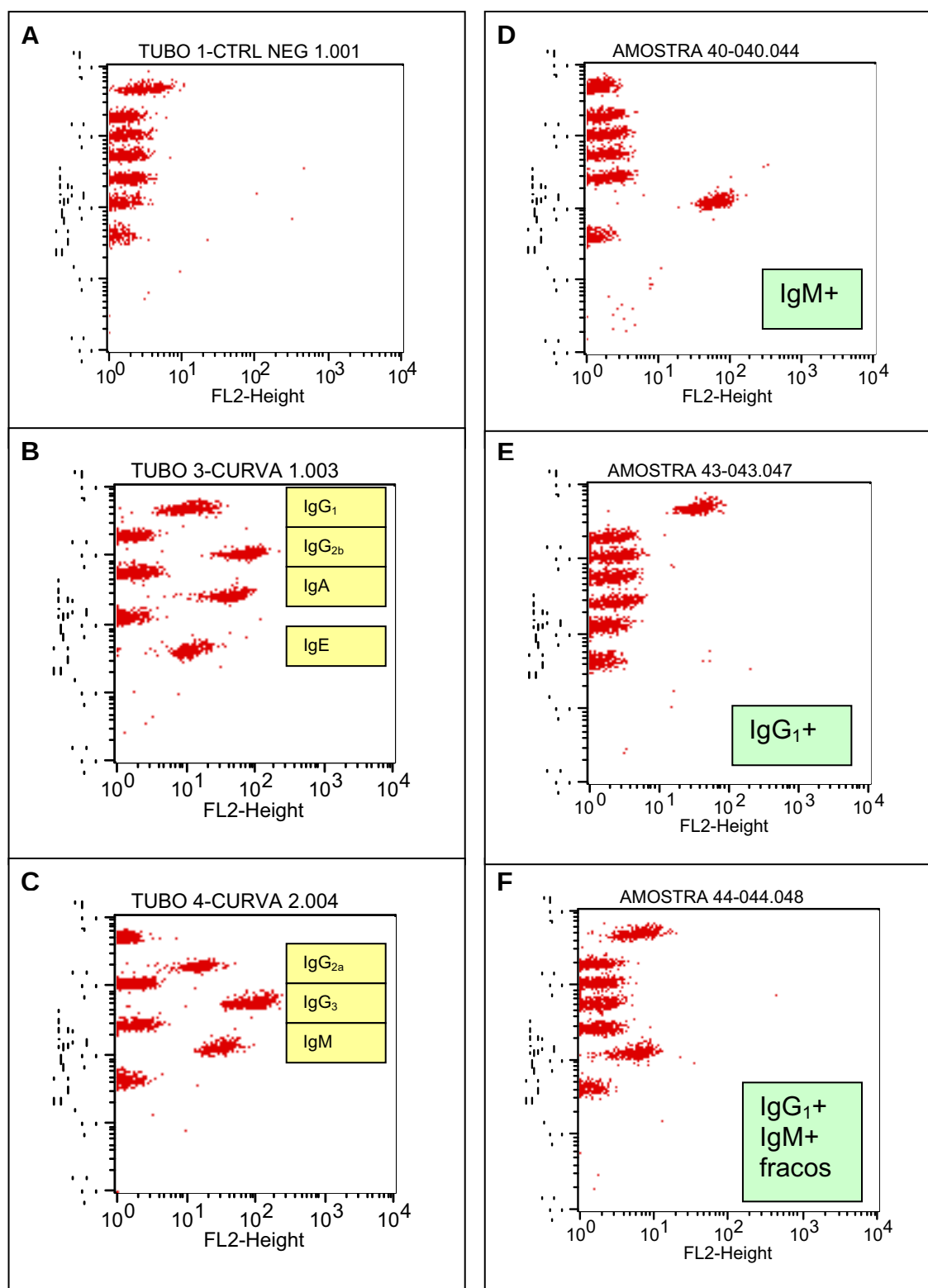


FIGURA 7 - Determinação de Classe e Subclasse de Imunoglobulinas murinas pelo método *CBAFlow* (BD Bioscience®). Controle negativo (A), controle positivo para IgG1, IgG2b, IgA, IgE (B), controle positivo para IgG2a, IgG3, IgM (C), amostra clone TAEB 3 – 16A6 (D), clone TAEB 1 – 40A3 (E), clone TAEB 1 – 40A4 (F).

Observa-se que as imunoglobulinas produzidas pelos clones TAEB 3 - 16A6 e TAEB 1 – 40A3 são, respectivamente, IgM e IgG₁. Entretanto, o clone TAEB 1 – 40A4 é secretor de duas imunoglobulinas de classes diferentes: IgM e IgG₁ e, portanto, não é monoclonal. Isso pode ocorrer quando na clonagem há a deposição de duas células (clones) na cavidade da placa de cultura e ambas desenvolvem-se, produzindo imunoglobulinas diferentes.

5.3.5 Produção de líquido ascítico

Devido ao grande número de clones obtidos para a produção de líquido ascítico, optou-se pela seleção dos clones que tivessem apresentado melhor padrão de reatividade ao teste ELISA indireto, na intenção de diminuir o uso de camundongos neste experimento. Foram selecionados 5 clones pertencentes aos híbridos TAEB com maior D.O. no último teste de ELISA para produção de líquido ascítico. Os mesmos critérios foram observados para a seleção de 5 entre os 18 clones TAEF.

Alguns camundongos foram a óbito, porém pôde-se obter líquido ascítico de todos os clones inoculados, o que determinou uma variação do volume final obtido (Tabelas 11 e 12).

TABELA 11 - Produção de líquido ascítico em camundongos BALB/c inoculados com clones produtores de imunoglobulina anti-extrato total de *Taenia saginata*, segundo o número de camundongos inoculados e o volume produzido.

Clone	Nº de animais inoculados	Volume (mL)	Dosagem proteínas totais (mg/mL)
TAEB 1 – 40A3	3	8,0	26,1
TAEB 1 – 53A4	3	14,5	24,8
TAEB 2 – 14A1	3	12,2	28,4
TAEB 2 – 14A2	4	22,3	22,9
TAEB 4 – 196A4	3	4,0	30,0
TAEB 5 – 31A3	3	9,7	26,0
TOTAL	19	$\bar{X} = 11,8$	$\bar{X} = 26,4$

TABELA 12 - Produção de líquido ascítico em camundongos BALB/c inoculados com clones produtores de imunoglobulina anti-fluido vesicular *Taenia saginata*, segundo o número de camundongos inoculados e o volume produzido.

Clone	Nº de animais inoculados	Volume (mL)	Dosagem proteínas totais (mg/mL)
TAEF 2 – 137A1	3	7,3	49,5
TAEF 2 – 137A6	3	9,3	44,4
TAEF 2 – 253A5	3	15,9	34,7
TAEF 2 – 270A2	4	16,0	41,7
TAEF 3 – 134A3	3	8,2	32,1
TOTAL	16	$\bar{X} = 11,3$	$\bar{X} = 40,5$

5.3.6 Avaliação eletroforética da monoclonalidade

O controle eletroforético foi realizado em gel de agar a 1 %. A Figura 8-A abaixo identifica a banda de albumina e o pico de gamaglobulina, além das outras frações da amostra de líquido ascítico do clone TAEB 2 - 14A2. A análise por densitometria aponta 5,0 % de gamaglobulinas, ou seja, 1,14mg/mL. A Figura 8-B representa a corrida eletroforética do produto purificado do clone TAEB2 - 14A2. A leitura de proteínas totais foi de 1,53mg/mL.

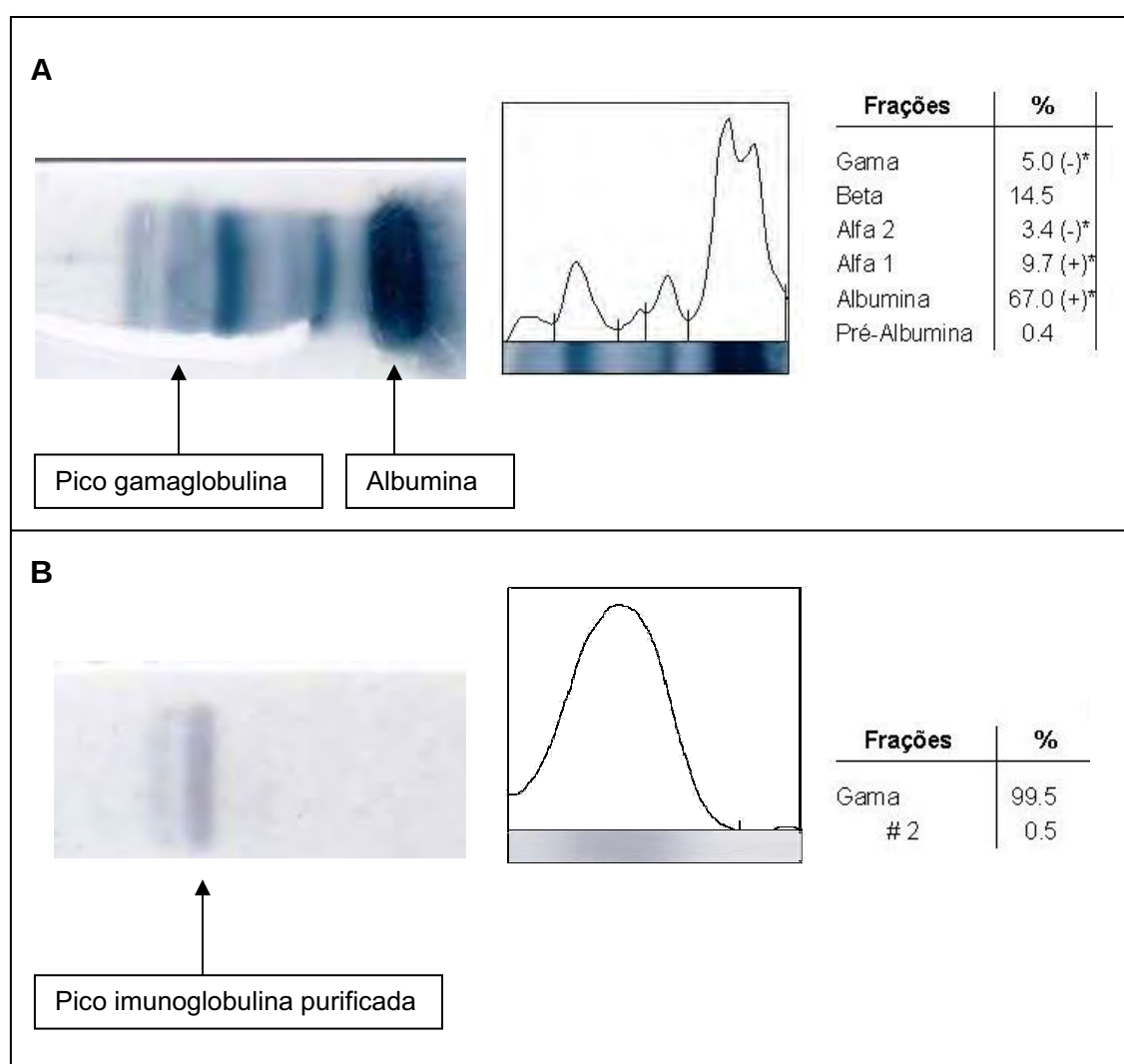


FIGURA 8 – Eletroforese em gel de agar a 1% em lâmina de vidro. (A) fração não purificada (líquido ascítico); (B) fração purificada.

5.3.7 Purificação

Todos os anticorpos monoclonais foram purificados a partir de líquido ascítico por cromatografia de afinidade.

A Figura 9 ilustra o resultado da purificação do anticorpo monoclonal obtido do líquido ascítico do clone TAEF 2 - 270A2, em pH abaixo de 5,5. O primeiro pico representa a albumina e outras proteínas murinas e o segundo pico a eluição da imunoglobulina de interesse. Na figura 10 a purificação de imunoglobulina de classe IgM resultante da produção do clone TAEB 1 – 53A4 é demonstrada.

Observou-se a concentração de 1,26mg/mL de anticorpo purificado para o clone TAEF 2 – 270A2 e 0,2mg/mL para o clone TAEB 5 – 53A4. O valor reduzido para a concentração de IgM está descrito como dentro do esperado (0,1 – 0,3 mg/mL) de acordo com o fabricante da coluna de purificação (Hi Trap IgM purification HP – GE Healthcare®).

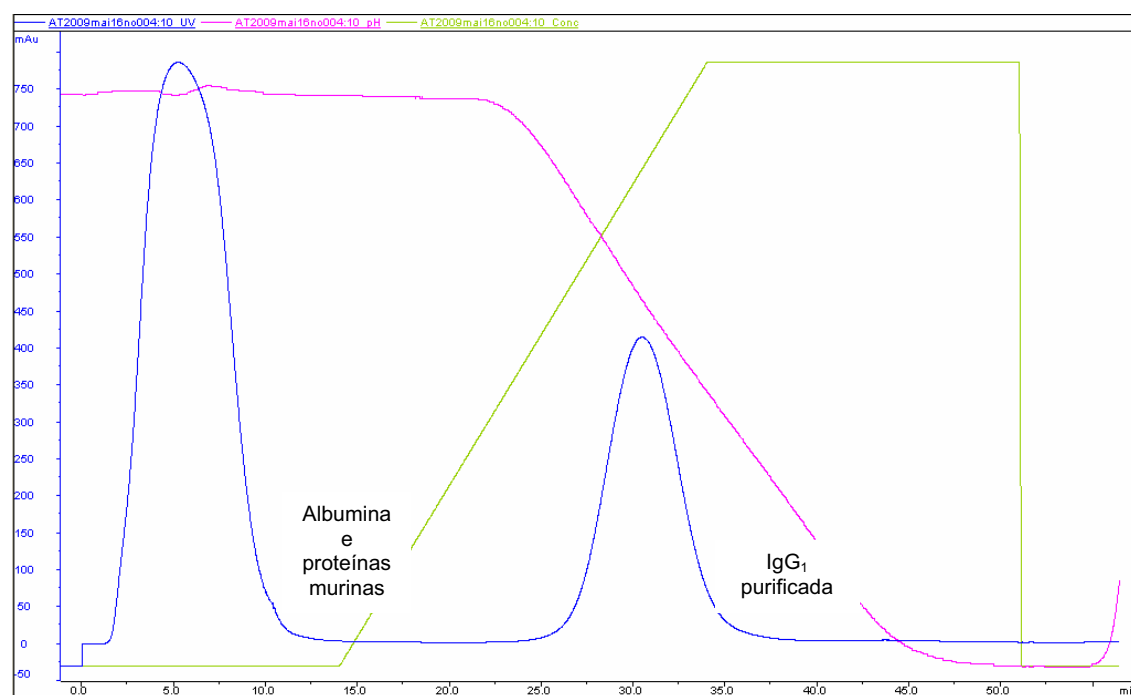


FIGURA 9 - Gráfico de leitura do aparelho AktaPrime® durante a purificação de líquido ascítico do clone TAEB 2 – 270A2, classe/subclasse IgG₁.

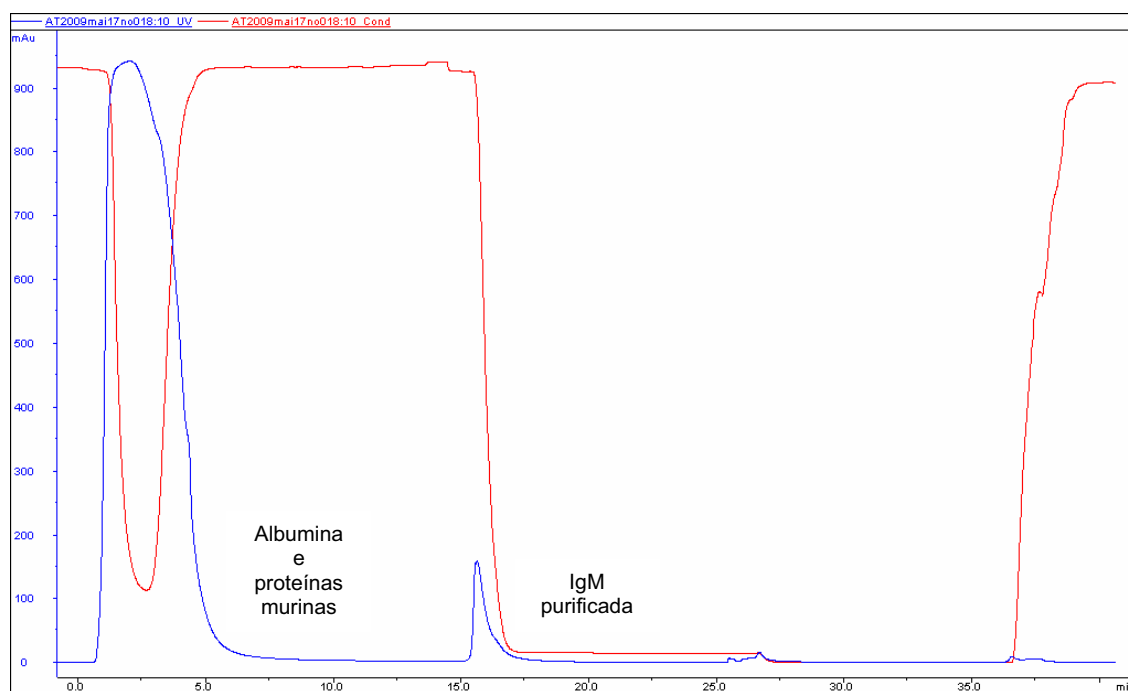


FIGURA 10 - Gráfico de leitura do aparelho AktaPrime® durante a purificação de líquido ascítico do clone TAEB 1 – 53A4, classe IgM.

5.4 Caracterização das frações protéicas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A Figura 11 mostra a separação das frações protéicas em gel de poliacrilamida. Os dois extratos antigênicos apresentaram frações protéicas de peso molecular variando entre 6 e 100kDa.

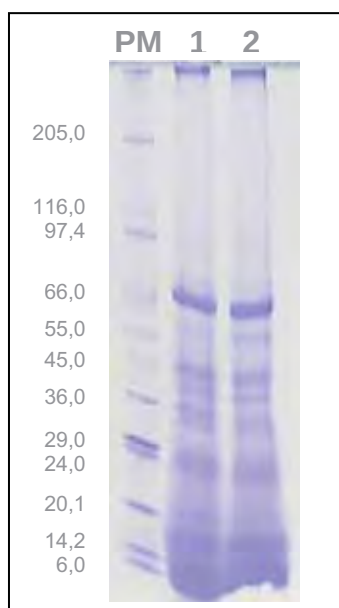


FIGURA 11 - Separação das frações protéicas dos dois extratos antigênicos obtidos. PM – padrão de peso molecular (Sigma®); extrato fluido vesicular (1); extrato total (2).

5.5 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por *Western Blotting*

Todos os líquidos ascíticos (TAEB e TAEF) reconheceram frações protéicas pertencentes aos antígenos homólogos e, na maioria dos casos, é visível mais de uma banda marcada no *Western blotting* (Figura 12).

O soro bovino de animal naturalmente infectado e com cisticercose generalizada foi testado, assim como o soro policlonal de coelho produzido neste trabalho, e ambos foram reagentes a frações de diversos pesos moleculares. O soro pré-imune de coelho foi incluído no teste, observando-se reação totalmente negativa ao antígeno (Figura 12 - B2). A amostra de soro bovino reconheceu diversas frações antigênicas que variaram de 200 a 24kDa (Figura 12 - A5). Já o soro policlonal de coelho reconheceu frações que variaram de 205 a 20kDa (Figura 12 - B1). Algumas das frações reconhecidas por ambos foram igualmente reconhecidas pelos anticorpos monoclonais produzidos.

No imunoblot, os líquidos ascíticos, em sua maioria, reconheceram a fração protéica de 66kDa, juntamente com outras frações de menor peso molecular. O clone TAEB4 – 196A4 reconheceu frações antigênicas de 66kDa, 55kDa e menor de 18kDa, enquanto que para os clones TAEB 2 – 14A1 e TAEB 2 – 14A2 os reconhecimentos foram semelhantes entre si. O anticorpo contido no líquido ascítico do clone TAEB 1 – 53A4 reconheceu bandas de aproximadamente 66, 55, 43, 38 e menor de 18kDa (Figura 12 - A). O clone TAEB 1 – 40A3 apresentou “background” muito forte, porém algumas frações parecem ser reconhecidas como 55, 66, 100kDa (Figura 13).

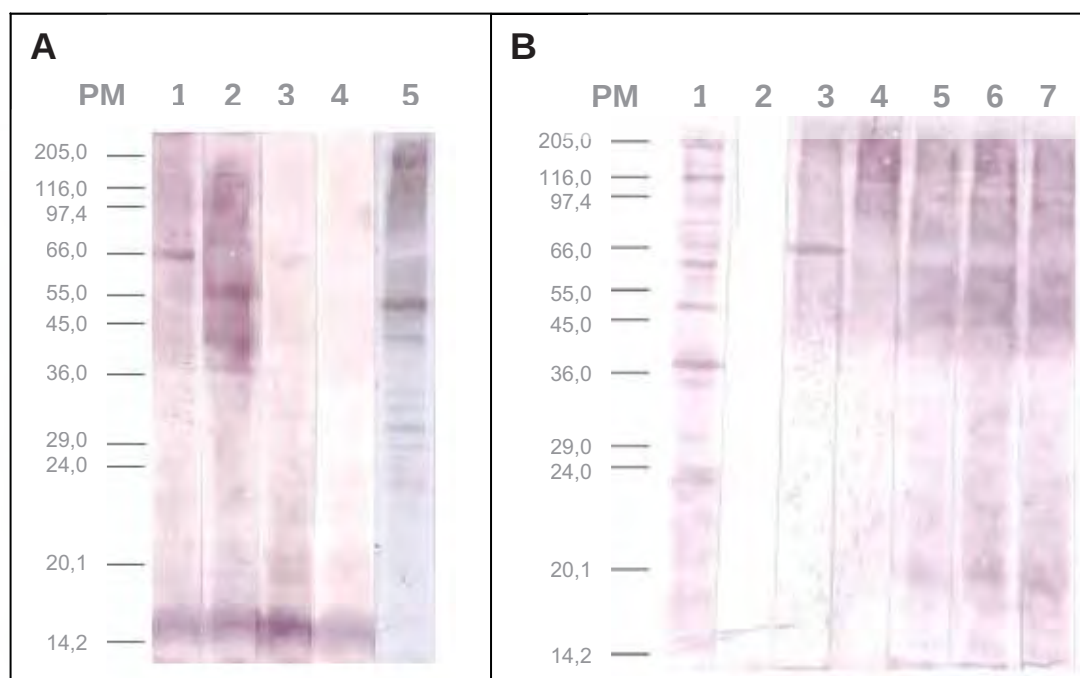


FIGURA 12- *Western blotting* para teste de reação dos anticorpos obtidos em líquido ascítico frente ao antígeno homólogo (A) extrato total de *T. saginata* (B) extrato de fluido vesicular de *T. saginata*. Em A, reação dos anticorpos produzidos pelos clones: TAEB4 - 196A4 (1); TAEB1 - 53A4 (2); TAEB2 - 14A1 (3); TAEB2 - 14A2 purificado (4); soro de bovino com cisticercose generalizada (5). Em B, soro policlonal do coelho (1); soro pré-imunização do coelho (2); clones: TAEF2 – 137A1 (3); TAEF2 – 137A6 (4); TAEF2 – 253A5 (5); TAEF 2 – 270A2 (6); TAEF 3 – 134A3 (7). À esquerda das imagens o padrão de peso molecular (PM) (Sigma®).

Para o protocolo TAEF o clone TAEF 2 – 137A1 apresentou única reação na altura da banda de 66kDa. Já os outros clones reconheceram frações de 100 e 66kDa (Figura 12-B).

Realizou-se, ainda, um *Western blotting* comparando a reação do sobrenadante (SNC) de cultura e do líquido ascítico provenientes do mesmo clone ao antígeno homólogo. Os sobrenadantes de cultura TAEB2 - 14A1 e TAEB2 - 14A2 foram reativos somente para frações menores de 18kDa, enquanto que os líquidos ascíticos dos mesmos clones reconheceram essas frações e a fração de 66kDa. Para o clone TAEB1 - 40A3, aparentemente, tanto o SNC quanto o líquido ascítico reconheceram as mesmas frações (Figura 13).

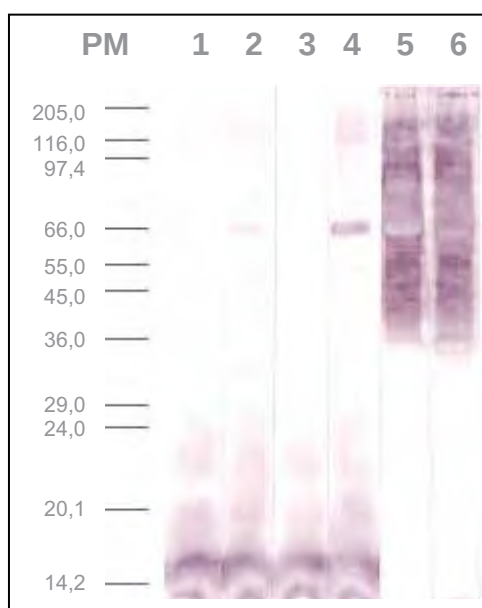


FIGURA 13 - *Western blotting* para teste de reação dos anticorpos obtidos em sobrenadante de cultura (SNC) e líquido ascítico frente ao antígeno homólogo extrato total de *T. saginata*. SNC clone TAEB2 - 14A1 (1); líquido ascítico clone TAEB2 - 14A1 (2); SNC clone TAEB2 - 14A2 (3); líquido ascítico clone TAEB2 - 14A2 (4); SNC clone TAEB1 - 40A3 (5); líquido ascítico clone TAEB1 - 40A3 (6). À esquerda o padrão de peso molecular (PM) (Sigma®).

A Tabela 13 apresenta as frações reconhecidas pelos diferentes anticorpos bem como a classe/subclasse de cada.

TABELA 13 - Reatividade imunológica, ao *western blotting*, dos anticorpos monoclonais produzidos frente ao antígeno homólogo de *Taenia saginata*, e a respectiva classe e subclasse.

Clone	Reatividade	Classe/subclasse
TAEB 1 – 40A3	55, 66, 100	IgG ₁
TAEB 1 – 53A4	66, 55, 43, 38, <18	IgM
TAEB 2 – 14A1	66, <18	IgG ₁
TAEB 2 – 14A2	66, <18	IgG ₁
TAEB 4 – 196A4	66, 55, <18	IgM
TAEF 2 – 137A1	66	IgG ₁
TAEF2 – 137A6	100, 66	IgG ₁
TAEF2 – 253A5	100, 66	IgM
TAEF 2 – 270A2	100, 66	IgG ₁
TAEF 3 – 134A3	100, 66	IgG ₁

5.6 Caracterização da reatividade imunológica dos anticorpos monoclonais por imunofluorescência indireta

A reatividade dos anticorpos monoclonais TAEB 2 - 14A2 e TAEF 2 – 270A2 utilizados nas reações de imunofluorescência indireta revelaram fluorescência em estruturas tanto do escólex (Figuras 14 e 15) quanto da membrana vesicular do parasita (Figura 16), para ambos os protocolos utilizados.

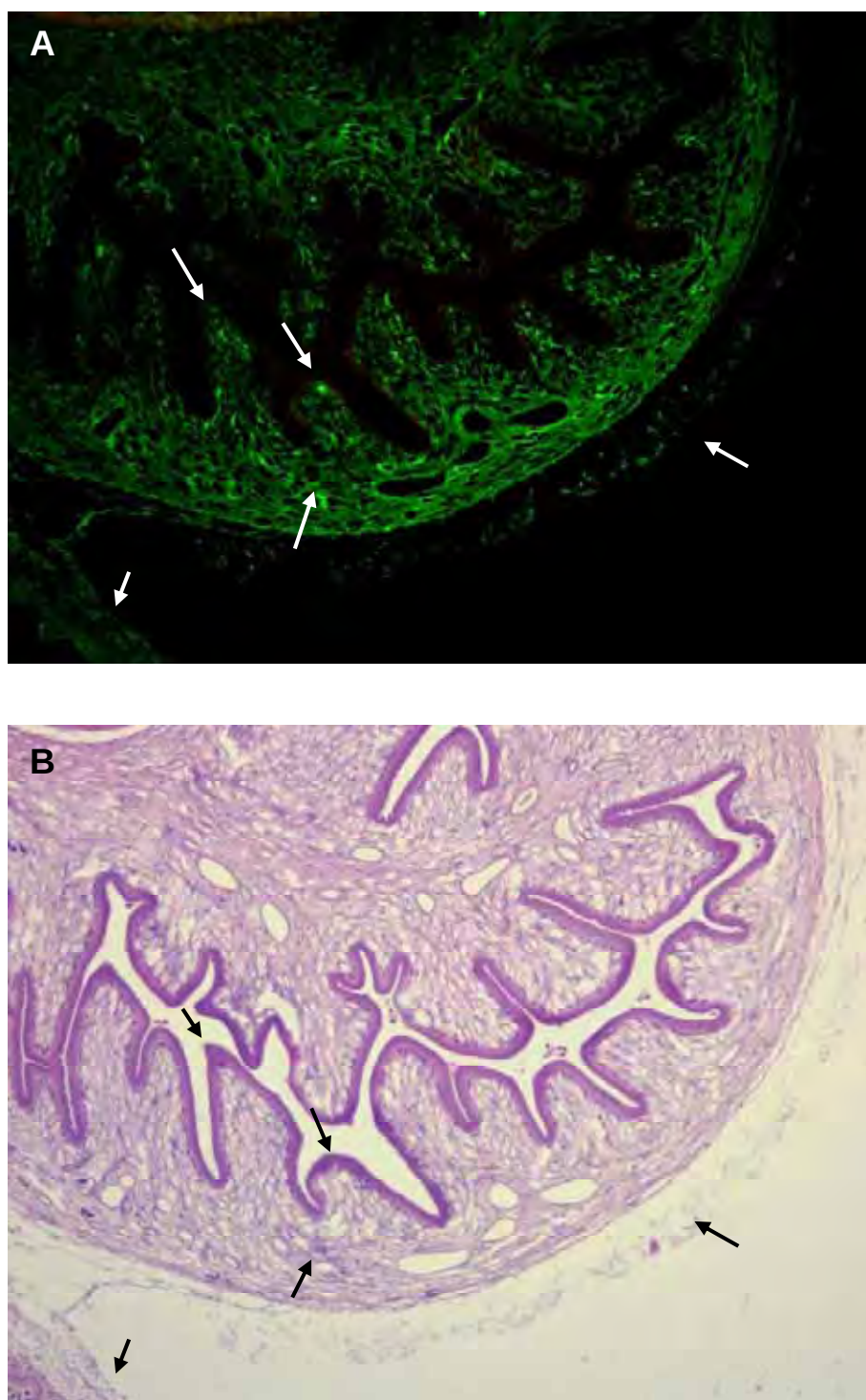


FIGURA 14 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato total de *Taenia saginata* TAEB 2 -14A2, em líquido ascítico de camundongo (A) e submetido à coloração de Hematoxilina-Eosina (B). (aumento de 10x)

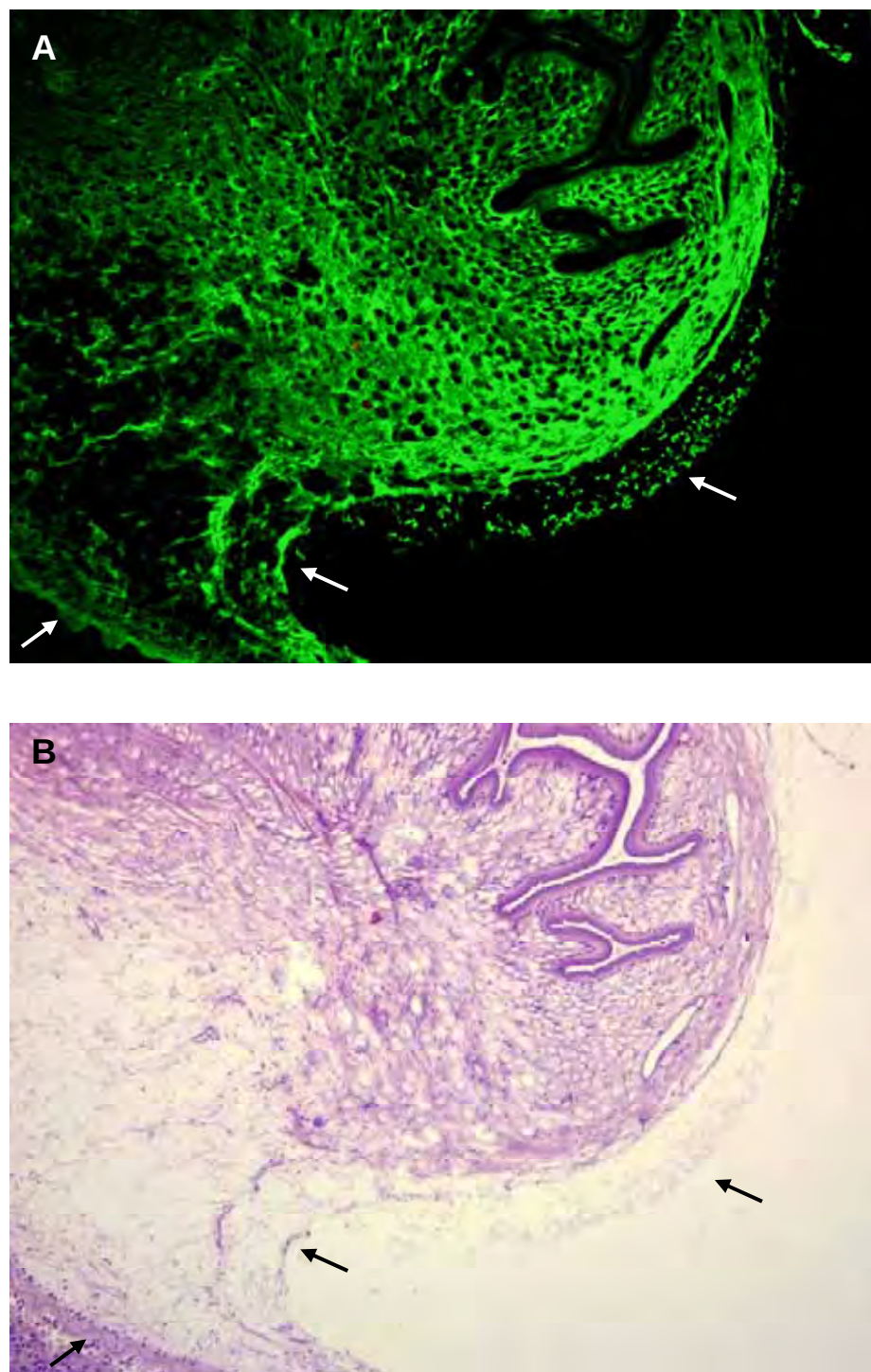


FIGURA 15 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato de fluido vesicular de *Taenia saginata* TAEF 2 – 270A2, em líquido ascítico de camundongo (A) e submetido à coloração de Hematoxilina-Eosina (B). Setas indicam a reatividade em áreas do escólex do parasita. (aumento de 10x)

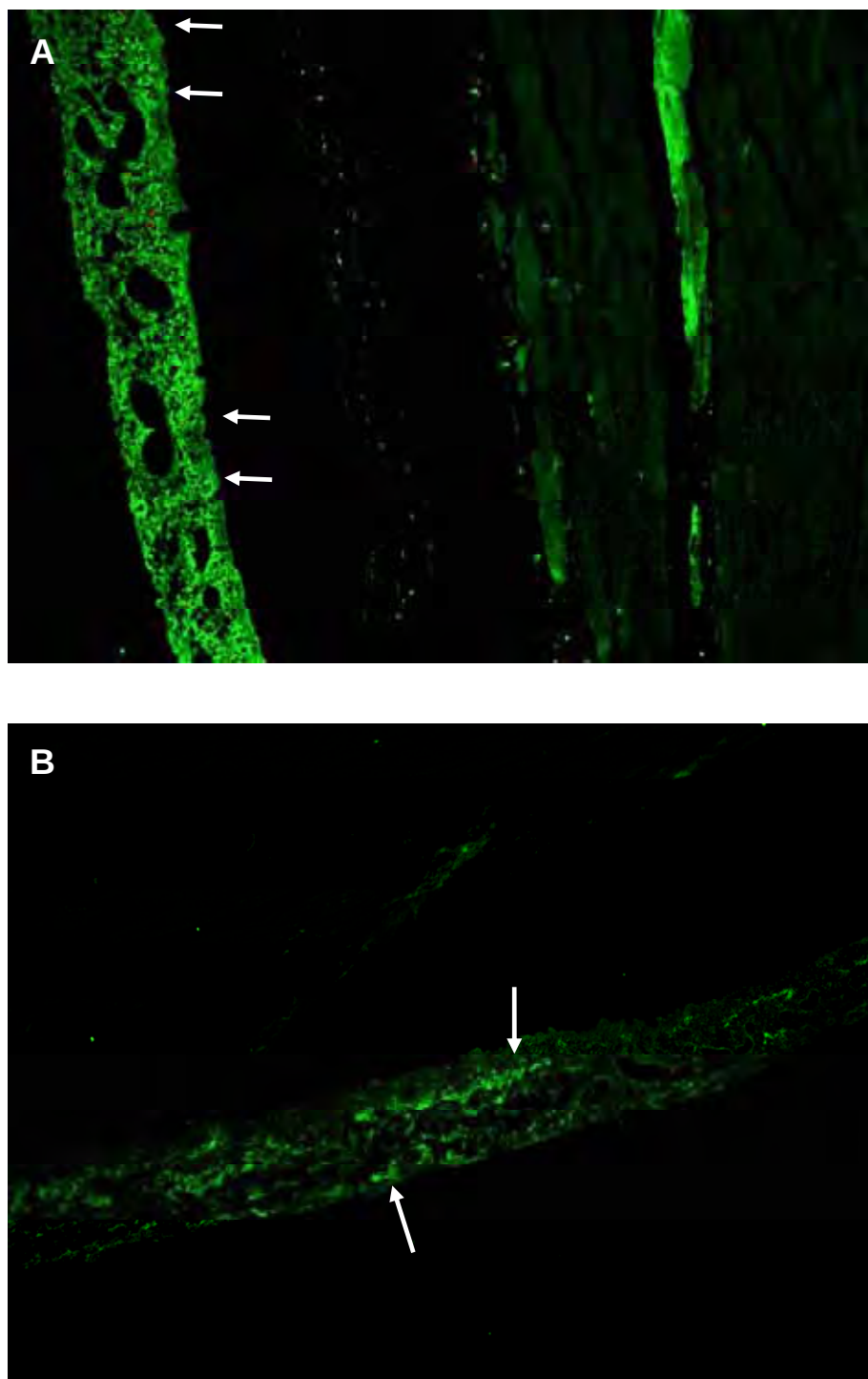


FIGURA 16 - Corte histológico de forma metacestóide de *Taenia saginata* submetido à reação de imunofluorescência indireta realizada com anticorpo monoclonal anti-extrato total TAEB 2 – 14A2 (A) e anti-extrato de fluido vesicular TAEF 2 – 270A2 de *Taenia saginata* (B). Setas indicam a reatividade em áreas da membrana vesicular do parasita. (aumento de 20x)

Discussão

6. DISCUSSÃO

Os adjuvantes, substâncias capazes de potencializar a resposta imunológica, são frequentemente utilizadas para melhorar a eficiência das imunizações. Com os resultados observados nos protocolos de fusão e clonagem, pode-se afirmar que o adjuvante de alumínio apresentou-se eficiente na potencialização da resposta imune nos camundongos. Estudos de avaliação do efeito imunogênico de antígenos associados a diferentes adjuvantes, quando compararam o adjuvante de *Freund* e o adjuvante de alumínio obtiveram respostas diferentes. Leal et al. (2002) relataram que o adjuvante de *Freund* apresentou melhor indução da resposta imune comparado ao hidróxido de alumínio, apesar dos valores terem sido estatisticamente significantes somente nas primeiras semanas. Nunes et al., (2009), entretanto, concluíram em sua pesquisa que os níveis de anticorpos produzidos para esses dois adjuvantes foram semelhantes. Não foi objetivo da presente pesquisa avaliar o efeito dos adjuvantes porém os resultados de imunização foram satisfatórios.

Os valores de porcentagem de híbridos testados após a fusão nos dois protocolos (TAEB e TAEF) que em média variaram de 26,0% a 29,1% estão dentro da média registrada em pesquisas já realizadas no Laboratório de Engenharia Celular onde $\frac{1}{4}$ dos híbridos construídos chegam efetivamente à fase de triagem (KRAUSE, 1999; SOUZA, 2009).

Durante os testes de triagem o desempenho dos hibridomas vai decaindo provavelmente devido ao fato de que cromossomos essenciais não são preservados nas divisões celulares. Assim, os anticorpos produzidos perdem a especificidade ao antígeno (HARLOW & LANE, 1988).

É possível observar nas Tabelas 6 e 7 que os híbridos do protocolo TAEB apresentaram maior reatividade ao antígeno que aqueles provenientes do protocolo TAEF, já que 5 híbridos deste último apresentaram baixa reatividade. Estas características de alta, média e baixa reatividade podem ser decorrentes da apresentação diferente dos antígenos. Além disso, essa disparidade em relação aos dois protocolos também pode ter sido decorrente

de contaminação das culturas por *Mycoplasma sp.*, problema detectado posteriormente à clonagem celular. Este microorganismo é dificilmente observado através da microscopia devido ao seu tamanho diminuto (0,3µm) (TIMENETSKY et al., 2009). Um de seus principais efeitos maléficos nas culturas contaminadas relaciona-se ao consumo de nutrientes e componentes básicos do metabolismo celular, como aminoácidos e vitaminas (SOUZA, 2009), sendo capaz de causar alterações no metabolismo celular, diminuição nas taxas de divisão celular e aberrações cromossômicas, podendo interferir na obtenção de anticorpos (TIMENETSKY et al., 2006).

Ainda que todos os cuidados tivessem sido tomados para garantir que o processo de diluição limitante e isolamento dos clones resultassem em única célula produtora de imunoglobulina, o clone TAEB 1 - 40A4 foi identificado como secretor de imunoglobulinas da classe IgG₁ e IgM pelo método de citometria de fluxo como mostra a Figura 7, portanto, não se trata de produto de um único clone, havendo necessidade de sub-clonagem.

Os sobrenadantes de cultura analisados por citometria de fluxo revelaram que os anticorpos monoclonais obtidos na presente pesquisa foram na maior parte imunoglobulinas da classe IgM, embora a obtenção da classe IgG tivesse sido objetivada, já que outros pesquisadores que realizam testes de ELISA para detecção de antígenos de *T. saginata*, ao utilizarem anticorpos monoclonais da classe IgG observaram um significativo incremento na sensibilidade e especificidade do teste comparado a IgM (VAN KERCKHOVEN et al, 1998). Sendo assim, foram preferencialmente selecionados para obtenção de anticorpos por líquido ascítico sete clones de 10 (63,6%) da classe IgG.

A produção de líquido ascítico se fez necessária para garantir seu uso posterior e otimização dos testes ELISA, perspectiva futura deste trabalho, por conter concentrações mais altas de imunoglobulinas secretadas que os sobrenadantes de cultura. O volume final de líquido ascítico obtido variou entres os animais devido aos óbitos de alguns camundongos, porém, a média

de volume de líquido ascítico (11,5mL) foi suficiente para a realização das análises propostas.

As mortes desses animais provavelmente estão relacionadas ao uso do Pristane[®], produto químico irritante que promove a secreção de nutrientes, criando um ambiente favorável para o crescimento de células tumorais - hibridomas. No entanto, alguns animais desenvolvem massas tumorais mais rapidamente, resultando no óbito do camundongo antes da coleta do líquido ascítico (HARLOW & LANE, 1988; COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL, 1999).

A maioria dos anticorpos monoclonais obtidos no presente trabalho identificaram frações antigênicas de baixo peso molecular (< 18kDa), embora alguns clones tenham reconhecido frações de 43, 55, 66 e 100kDa. Outros autores também observaram frações antigênicas de peso molecular mais elevado como as descritas por Harrison et al. (1989), com peso variando de 155-220kDa, 30, 43 e 55kDa; por Joshua et al. (1990), que observaram a reatividade das frações com 43, 72 e 185kDa, além de frações de baixo peso molecular, e por Brandt et al. (1992) que observaram frações de peso 87 e 100kDa. Tal resultado é bastante promissor do ponto de vista de aplicação futura uma vez que outros autores sugerem que proteínas de peso molecular abaixo de 20kDa são imunodominantes nas cisticercoses, resultado este observado não somente para os antígenos de *Taenia saginata* (JOSHUA et al., 1990; HARRISON et al., 1989), mas também para antígenos de *Taenia solium* (GOTTSTEIN et al., 1987; TSANG et al., 1989; YANG et al., 1998) e *Taenia crassiceps* (ESPÍNDOLA et al., 2000).

O desenvolvimento de uma proteína recombinante (HP6-Tsag) de adesão da oncosfera com peso molecular de 18kDa utilizada para diagnóstico da cisticercose, além de agente de imunização capaz de estimular a imunidade em bovinos (HARRISON & PARKHOUSE, 1986; FERRER et al., 2003; HARRISON et al., 2005; ABUSEIR et al., 2007; FERRER et al., 2007), confirma a maior especificidade de frações de baixo peso molecular.

O reconhecimento frequente da fração protéica de 66kDa poderia significar que todos os anticorpos produzidos são reagentes à albumina bovina, proteína com este peso molecular, e a outras proteínas ao mesmo tempo, podendo gerar dúvidas quanto à monoclonalidade dos mesmos. Entretanto, sabe-se que o epítipo pode ser uma proteína estrutural relativamente pequena, existindo a chance de epítipos semelhantes serem observados em mais de um polipeptídeo (HARLOW & LANE, 1988). Uma explicação para tal resultado seria a de que a reatividade observada tenha sido contra albumina presente nos extratos antigênicos. Kalinna et al. (1989) comprovaram a existência de albumina bovina no fluido vesicular de metacestóides de *T. saginata*, ao analisarem a reação de anticorpo monoespecífico produzido em camundongo inoculado com albumina. Joshua et al. (1990) também identificaram a fração de albumina bovina no fluido vesicular de metacestóides de *T. saginata*.

Quando se observou a reatividade comparada entre os SNC e os líquidos ascíticos do mesmo clone, pôde-se notar que os SNC de dois clones (TAEB 2 – 14A1 e TAEB 2 – 14A2) não reagiram à essa fração protéica, enquanto que o líquido ascítico reagiu fortemente (Figura 13). Segundo Harlow & Lane (1988), proteínas de tamanho relativamente grande podem ser imunogênicas ao camundongo, provocando a produção de anticorpos contra as mesmas, as quais serão “contaminantes” no líquido ascítico coletado. Essa possibilidade foi considerada remota neste trabalho devido ao pequeno período de exposição dos camundongos que seria insuficiente para produção de grandes concentrações de anticorpos “contaminantes” e porque o anticorpo purificado TAEB 2 – 14A2 também reconheceu a fração protéica de 66kDa. Desta forma, a hipótese mais provável é que a baixa concentração de anticorpos no sobrenadante de cultura em relação ao líquido ascítico não foi capaz de produzir uma forte marcação no *Western blotting*.

A reatividade dos anticorpos monoclonais utilizados nas reações de imunofluorescência indireta apresentados revelaram que há reconhecimentos de frações antigênicas de estruturas tanto do escólex quanto da membrana vesicular do parasita (Figuras 14, 15 e 16), sem contudo revelar reatividade ao tecido muscular do hospedeiro (Figura 16A). Tal resultado reforça a hipótese

de que o reconhecimento dos anticorpos monoclonais está mais relacionado às frações antigênicas do parasita que à possível contaminação com albumina bovina.

Conclusões e Perspectivas

7. CONCLUSÕES

- Foi possível produzir hibridomas secretores de anticorpos contra extrato total e de fluido vesicular de formas metacestóides de *T. saginata*;
- Obtiveram-se clones secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos das formas metacestóides de *T. saginata*;
- A maioria dos anticorpos monoclonais obtidos foram da classe IgM (55,4%) em relação aos da classe IgG (36,5%);
- Os anticorpos monoclonais produzidos tanto contra extrato total como contra extrato de fluido vesicular de *T. saginata* reconheceram frações protéicas de peso molecular variando entre < 18, 43, 55, 66 e 100kDa;
- Os anticorpos monoclonais produzidos tanto contra extrato total como contra extrato de fluido vesicular de *T. saginata* reconheceram estruturas do escólex e da membrana vesicular do parasita.

8. PERSPECTIVAS

Pretende-se prosseguir com a caracterização dos anticorpos monoclonais já obtidos contra extrato total além de obter outros anticorpos monoclonais contra extrato de fluido vesicular para que se possa constituir um teste ELISA para identificação de antígenos de *Taenia saginata* em amostras de soro de bovinos naturalmente infectados. Os anticorpos monoclonais produzidos deverão ainda ser testados para avaliar sua potencialidade na detecção de pacientes com neurocisticercose.

Bibliografia

9. BIBLIOGRAFIA

ABUSEIR, S.; EPE, C.; SCHNEIDER, T.; KLEIN, G.; KÜHNE, M. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal? *Parasitol. Res.* 99 (4): 405-409, 2006.

ABUSEIR, S.; KUHNE, M.; SCHNIEDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. *Parasitol. Res.* 101 (1): 131-137, 2007.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2a ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud (OPAS). 989, 1986. Publicação Científica 503.

ARRUDA PINTO, P.S.; VAZ, A.J.; GERMANO, P.M.L.; NAKAMURA, P.M. Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. *Vet. Parasitol.* 88: 127-130, 2000.

BIONDI, G.F., MUCCIOLO, R.G., NUNES, C.M., RICHTZENHAIN, L.J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. *Vet. Parasitol.* 64: 261-266, 1996.

BRANDT, J.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRYNS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 22: 471-477, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal*. Brasília: Ministério da Agricultura. 116p, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Brasília. 241p, 1997.

BROW, G.; LING, N.R.; SHAPIRO, H. *Practical flow cytometry*. 3.Ed. New York: Wiley Liss, 1995, 353p.

CAIXETA, L.; CAIXETA, M.; ALMEIDA NETO, J.C. Neurocisticercose: forma psíquica e demência. *Rev. Patol. Trop.* 33(1): 33-44, 2004.

COMMITTEE ON METHODS OF PRODUCING MONOCLONAL. *Monoclonal Antibody Production*. National Academy Press. Washington, DC, 1999.

DAVIS, J.N. *Basic cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1994. 301p.

DEFFUNE, E. *et al. Manual GMP-BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu*, HC, FM, UNESP, 2ª versão, p.134, 1996.

DEFFUNE, E. Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Intérêt en immunohématologie. Paris, 1992. *Tese Doutorado – Área Imunologia*. Universidade Pierre et Marie Curie – VI.

DIAZ-CAMACHO, S., CANDIL-RUIZ, A.; URIBE BELTRAN, M.; WILLMS, K. Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84(4): 563-566, 1990.

DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica*. 87: 79-86, 2003.

DORNY, P.; PHIRI, I.; GABRIEL, S.; SPEYBROECK, N.; VERCRIJSSE, J. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. *Vet. Parasitol.* 104: 211-215, 2002.

DORNY, P. & PRAET, N. *Taenia saginata* in Europe. *Vet. Parasitol.* 149 (1-2): 22-24, 2007

DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, W.; BERKVENS, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Vet. Parasitol.* 88: 43-49, 2000.

DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. *Res. Vet. Sci.* 58: 99-100, 1995.

ESPÍNDOLA, N.M.; DE GASPARI, E.N.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 42(3): 175-177, 2000.

FERNANDES J. O. M., BUZETTI W. A. S. Prevalência de Cisticercose Bovina em animais abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal, da 9ª região administrativa de Araçatuba, SP *Higiene Alimentar*. 15 (87): 30-37, 2001.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M. BRYCE, D.; WAMMAE, L.W. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 111: 83-94, 2003.

FERRER, E.; GONZALEZ, L.M.; MARTINEZ-ESCRIBANO, J.A., GONZALEZ-BARDERAS, M.E.; CORTEZ, M.M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol. Res.* 101: 517-525, 2007.

FLISSER, A. - Neurocysticercosis in México. *Parasit. Today*. 4: 131-136, 1988.

FORTES, E. *Parasitologia Veterinária*. 3ª ed. São Paulo: Ícone, 1997.

FRANCO, S.S.; HINCAPIÉ, M.C.; MEJIA, O.; BOTERO, D. Estudio epidemiológico de epilepsia y neurocysticercosis. *Rev. Univ. Indust. Santander (Colômbia)*. 14: 129-141, 1986.

GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H; PALACIOS, L.G.; JIMENEZ, I.; RODRIGUEZ, S.; VERASTEGUI, M.; WILKINS, P.; TSANG, V.C. Short report: transient antibody response in *Taenia solium* infection in field conditions – a major contributor to high seroprevalence. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 31-32, 2001.

GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; CATAFORA, M.; VERASTEGUI, M.; GONZALEZ, A.E.; TSANG, V.C.; THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Serological evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. *J. Infect. Dis.* 175: 486-489, 1997.

GEMMELL, M.A.; JOHNSTONE, P.D. Experimental epidemiology of hydatidosis and cysticercosis. *Adv. Parasitol.* 15: 311-369, 1977.

GEUS, B. & HENDRIKSEN, C.F.M. In vivo and in vitro production of monoclonal antibodies: current possibilities and future perspectives (74th Forum in Immunology) *Res. Immunol.* 149: 533-620, 1998.

GHEBREKIDAN, H. The effect of different chemical and physical agent on the viability of *Cysticercus bovis*: a preliminary report. *Ethiop. Med. J.* 30: 23-31, 1992.

GORDON, J. Human Monoclonal Antibodies. In: CATTY, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL Press, 1988. 1 (4), p.105-112.

GOTTSTEIN, B; ZINI, D., SCHANTZ, P.,M. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop. Med. Parasit.*, 38: 299-303, 1987.

HARLOW, E.; LANE, D. Eds. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

HARRISON, L.J.S.; JOSHUA, G.W.P.; WRIGHT, S.H.; PARKHOUSE, R.M.E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 11: 351-370, 1989.

HARRISON, L.J.S.; GARATE, T.; BRYCE, D.M.; GONZALEZ, L.M.; FOSTER-CUEVAS, M.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; PARKHOUSE, R.M.E. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. *Trop. Anim. Health and Product.* 37(2): 103-120, 2005.

HARRISON, L.J.S. & PARKHOUSE, R.M.E. Passive protection against *Taenia saginata* infection in cattle by a mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. *Paras. Immunol.* 8: 319-332, 1986.

HAYDEN, G.E.; WALKER, K.Z.; MILLER, J.F. Simultaneous cytometric analysis for the expression of cytoplasmic and surface antigens in activated T cells. *Cytometry*, 9(1): 44-51, 1988.

HAYUNGA, E.G.; SUMMER, M.P.; RHOADS, M.L.; MURREL, K.D.; ISENSTEIN, R.S. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an

antigen isolated from *Taenia spp* cyst fluid. *Am. J. Vet. Res.* 52(3): 462-470, 1991.

JOSHUA, G.W.P.; HARRISON, L.J.S.; SEWELL, M.M.H. Protein antigens in the cyst fluid of *Taenia saginata* cisticerci. *Parasitol.* 100: 463-467, 1990.

KALINNA, B.; BECKER, M.; GEYER, E. Immunoelectrophoretic analyses of antigens shared by the vesicular fluid and cyst wall of *Taenia crassiceps* and *Taenia saginata* metacestodes. *Parasitol. Res.* 75: 568-574, 1989.

KAMANGO-SOLLO, E.I.P.; LINDQUIST, D.J.; GATHUMA, J.M. Bovine serum components in *Taenia saginata* cisticerci (*C. bovis*). *Bull. Anim. Health Prod. Africa.* 33: 1-3, 1985.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497, 1975.

KRAUSE, A. *Produção e Caracterização de Anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos eritrocitários suínos*. 1999. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu.

KYVSGAARD, N.C., ILSOE, B., HENRIKSEN, S.A., NANSEN, P. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. *Res. Vet. Sci.* 49: 29-33, 1990.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-684, 1970.

LAWSON, J.R.; GEMMELL, M.A. Hydatidosis and cysticercosis: the dynamics of transmission. *Adv. Parasitol.* 22: 261-308, 1983.

LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M.; LEAL, A.B.M.; PINTO, A.M.; GRIEBELER, J.; FLORES, E.F.; FERREIRO, L.; CATTO, J.B. Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. *Ciênc. Rural.* 32(6): 1027-1032, 2002.

MACHNICKA, B. & GRZYBOWSKI, J. Host serum proteins in *Taenia saginata* metacestode fluid. *Vet. Parasitol.* 19: 47-54, 1986.

MARQUES, G.M.; BUZI, K.A.; GALINDO, L.A.; BALDINI, E.D.; BIONDI, G.F. Avaliação dos registros de condenação por cisticercose em bovinos abatidos em frigoríficos da região centro oeste do estado de São Paulo – 1996 a 2000. *Vet e Zootec.* 15 (1): 114-120, 2008.

MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; DIAS, F.S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. *Vet. Parasitol.* 141: 260-263, 2006.

MONTENEGRO, T.C.; MIRANDA, E.A.; GILMAN, R.; THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 90(2): 145-155, 1996.

MOREIRA DOS SANTOS, W.L. Ocorrência da cisticercose em bovinos abatidos. *Rev. Nac. da Carne.* 25: 28-29, 1998.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J.A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytomeric bead assay: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clin. Immunol.* 110: 252-266, 2004.

NEVES, D. P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NUNES, RT. *Achados de cisticercose bovina em estabelecimento oficial no estado de Santa Catarina*. 2008 Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista) - Universidade Castelo Branco, Curitiba.

NUNES, M.V.O.; CÂMARA, C.P.; CRESPO, A.M.C.; CARVALHAES, M.; OLIVEIRA, C.R.; SILVEIRA, L.A. Comparação do perfil de anticorpo anti-imunoglobulina G em murinos imunizados com IgG humana associada a diferentes adjuvantes. *Rev. Eletrônica de Farmácia.* 6(1): 44-50, 2009.

O.I.E. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2.10.1. Cystercosis. Acesso em 13 jan. 2008. On line. Disponível na Internet http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00127.htm.

OLIVEIRA, H.B.; MACHADO, G.A.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the

serological diagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol. Res.* 101: 1007-1013, 2007.

ONYANGO-ABUJE, J.; HUGHES, G.; OPICHA, M.; NGINYI, M.K.; RUGUTT, K.M.; WRIGHT, H.S.; HARRISON, S.J.L. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. *Vet. Parasitol.* 61: 221-230, 1996a.

ONYANGO-ABUJE, J.; NGINYI, J.M.; RUGUTTT, M.K.; WRIGHT, S.H.; LUMUMBA, P.; HUGHES, G.; HARRISON, L.J. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. *Vet. Parasitol.* 64: 177-185, 1996b.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Zoonosis parasitarias*: informe de un Comité de Expertos de la OMS, con la participación de la FAO. Ginebra: OPS, 1979.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Epidemiología y Control de la Teniasis-Cisticercosis en America Latina*. OPS. Volume 3, 1994.

PAWLOWSKI, Z. Taeniasis and cysticercosis. In: JACOBS, L.; ARAMBULO, R. (Eds). *Parasitic zoonosis*. Boca Raton: C.R.C. Press, 1982, v. 1, p.313-48.

PAWLOWSKI, Z., SCHULTZ, M.G. Taeniasis and cysticercosis. *Adv. Parasitol.*, 10: 269-343, 1972.

PEREIRA, M.A.V.C, SCHWANZ, V.S., BARBOSA, C.G. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do estado do rio de janeiro, submetidos ao controle do serviço de inspeção federal (sif-rj), no período de 1997 a 2003* *Arq. Inst. Biol.* 73 (1): 83-87, 2006.

PRICE, K.M. Production and characterization of synthetic peptide-derived antibodies In: RITTER, M.A. & LADYMAN, H.M. (Eds.). *Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. Cap. 5, p.66-68.

SCHANTZ, P.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAWLOWSKI, Z.S. La erradicabilidad potencial de la Taeniasis y la Cisticercosis. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* 116: 465-469, 1994.

SMITH, H.J.; SNOWDON, K.E.; FINLAY, R.C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. *Can. J. Vet. Res.* 55(3): 274-276, 1991.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 7ed. London, 1982.

SOUZA, A.V.G. *Dificuldades na obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais murinos anti-proteína F recombinante do vírus sincicial respiratório humano (RSV) para diagnóstico laboratorial.* 2009. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SOUZA, V.K., PESSOA-SILVA, M.C., MINOZZO, J.C., THOMAZ-SOCCOL, V. Prevalência da cisticercose bovina no estado do Paraná, sul do Brasil: avaliação de 26.465 bovinos inspecionados no SIF 1710. *Semina: Ciências Agrárias*, 28 (4): 675-684, 2007.

THEIS, J.H.; CLEARY, M.; SYVANEN, M.; GILSON, A.; SWIFT, P.; BANKS, J.; JOHNSON, E. DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55(4): 456-458, 1996.

TIMENETSKY, J.; SANTOS, L.M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 907-914, 2006.

TIMENESTKY, J. *Micoplasmas*. Acesso em 05 maio de 2009. Disponível online em: <http://www.icb.usp.br/~bmm/jorge.pdf>

TOWBIN, J.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354, 1979.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A. & BOYER, A.E. Na enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159: 50-59, 1989

UNGAR, M.L.; GERMANO, P.M.L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Públ.* (26): 167-72, 1992.

VAN KERCKHOVEN, I.; VANSTEENKISTE, W.; CLAES, M.; GEERTS, S.; BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet. Parasitol.* 76: 269-274, 1998.

VAZ, A.V.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M. F.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57(3): 354-357, 1997.

VOLLKOPF, P.C. & XAVIER, M.M.B.B.S. Prevalência de cisticercose em bovinos abatidos sob inspeção sanitária em Campo Grande – MS. In: Congresso brasileiro de Medicina Veterinária , 2008.

<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1314-1.pdf>

WANZALA, W.; KYULE, N.M.; ZESSIN, K.H.; ONYANGO-ABUJE, A.J.; KANG'ETHE, K.E.; OCHANDA, H.; HARRISON, J.S.L. Evaluation of an antigen-ELISA in the diagnosis of bovine cisticercosis in Kenyan cattle. *Parasitol. Res.* 100: 539-548, 2007.

YANG, H.J.; CHUNG, J.Y.; YUN, D.H.; KONG, Y.; ITO, A.; MA, L.; LIU, Y. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol.* 20: 483-488, 1998.

YANG, H.J. & CHUNG, Y.B. Immunolocalization of the 150kDa protein in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Korean J. Parasitol.* 42(2): 81-84, 2004.

ZAMPINI, L.M. Cisticercose Bovina no Paraná no período de 1982 a 1988. *Hig. Aliment.* 8 (30): 24-25, 1994.

Artigo Científico

Trabalho enviado para a Revista *Experimental Parasitology* .

RESEARCH BRIEF

***Taenia saginata*: production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens**

Josy Campanhã Vicentini-Oliveira¹; Marjorie A. Golim²; Silvana de Cássia Paulan³;
Germano Francisco Biondi⁴; Rosana Rossi-Ferreira⁵; Elenice Deffune⁶; Cáris Maroni
Nunes^{7*}

¹São Paulo State University, UNESP, campus Botucatu, Graduation Program on
Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Zootechny 18618-000
Botucatu, SP, Brazil.

²São Paulo State University, UNESP, campus Botucatu, Flowcitometry Laboratory,
Blood Center, Faculty of Medicine, 18618-970 Botucatu, SP, Brazil.

³São Paulo State University, UNESP, campus Araçatuba, Graduation Program on
Animal Science, 16050-680, Araçatuba, SP, Brazil.

⁴São Paulo State University, UNESP, campus Botucatu, Department of Hygiene and
Public Health, School of Veterinary Medicine and Zootechny, 18618-000, Botucatu, SP,
Brazil.

⁵São Paulo State University, UNESP, campus Bauru, Department of Biological
Sciences, Faculty of Science, 17033-360, Bauru, SP, Brazil.

⁶São Paulo State University, UNESP, campus Botucatu, Cellular Engineering
Laboratory, Blood Center, Faculty of Medicine, 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

⁷UNESP, campus Araçatuba, Department of Animal Health and Production, Rua Clóvis
Pestana, 793, Jd. D. Amélia, Araçatuba, SP, Brazil, 16050-680.

e-mail: *caris@fmva.unesp.br*

* Corresponding author. E-mail address: *caris@fmva.unesp.br*

Phone number: 00 55 18 3636 1365; Fax number: 00 55 18 3622 6487

Abstract

Cysticercosis is a major cause of economic losses in bovine production due to meat condemnation. Chemotherapy is used to control infection in Brazilian cattle and a diagnostic test to monitor treatment is desired. We produced monoclonal antibodies against crude (TAEB) and cyst fluid (TAEF) *Taenia saginata* metacestode antigens using immunized BALB/c mice. After cell fusion, ten TAEB and nine TAEF hybrids were selected and cloned resulting in 18 IgG₁ and 32 IgM TAEB clones, and 9 IgG₁ and 9 IgM TAEF clones. Ascites was produced and western blotting was performed resulting in reactivity to protein fractions of low molecular weight (<18kDa), 43, 55, 66 and 100kDa. The indirect immunofluorescence test showed that monoclonal antibodies against crude and cyst fluid antigens recognize antigenic fractions of both the scolex and the bladder wall of metacystodes from naturally infected bovine. The monoclonal antibodies obtained will be tested on a based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring treatment in cattle.

Keywords: monoclonal antibody (MAb); *Taenia saginata*; bovine cysticercosis; crude antigen; cyst fluid.

1. Introduction

Cysticercosis by *Taenia saginata* infection occurs worldwide and is a major cause of economic losses in bovine production due to meat condemnation to control taeniasis-cysticercosis complex (Theis et al, 1996; Caixeta et al., 2004; OIE, 2004). The adult tapeworm lives in the small intestine of humans that became infected after eating raw or undercooked beef harboring viable cysts (Pawlowski, 1982; Fortes, 1997; Neves et al., 1998).

Meat inspection, one of the public health control measure used in Brazil, identifies only heavily infected cattle when it is already too late to avoid economic losses (Kyvsgaard et al., 1990; Onyango-Abuje et al., 1996b; Abuseir, et al., 2006). Chemotherapy is being used in Brazilian cattle to control infection and diagnostic tests that detect live parasites or their products could be applied to improve treatment.

Promising results have been obtained using a monoclonal antibody (MAb)-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of circulating excretory-secretory products in *T. saginata* cysticercosis (Harrison et al., 1989; Brandt et al., 1992; Draelants et al., 1995; Onyango-Abuje et al., 1996a; Van Kerckhoven et al., 1998).

Some antigenic fractions were already described as important for differentiating positive from negative animals. Harrison et al. (1989) described fractions of molecular weight of 30, 43, 55 kDa and between 155-220kDa identified by MAbs HP10. The MAbs 12G5 and 2H8 described by Brandt et al. (1992) reacted with antigenic components of extract *T. saginata* adult of 87, 100kDa and secretion-excretion products of 65kDa. Joshua et al. (1990) analyzed protein antigenicity from vesicular fluid of *T. saginata* cysticerci and observed immunogenic proteins of 12, 14, 16 and 20kDa in the vesicular fluid antigens at 4, 8, 12 and 16 weeks after experimental infection in cattle.

We aimed at producing and characterizing murine monoclonal antibodies (MAbs) against crude (TAEB) and cyst fluid (TAEF) *T. saginata* metacestode antigens to be used, in the near future, on a based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

2. Materials and methods

This research had the approval of the Animal Experimentation Ethics Board from the School of Veterinary Medicine and Zootechny of São Paulo State University – UNESP (process nº 50/2007-CEEA).

Taenia saginata metacestodes were excised from the skeletal muscle of naturally infected cattle from Sao Paulo State, Brazil, during slaughter procedures. After dissection, pooled cysts were washed in phosphate-buffered saline (NaCl 0.15 M) at 4°C. in presence of protease inhibitor (PMSF 25mm). The crude *T. saginata* antigen (TAEB) was processed as described by Montenegro et al. (1996) and cyst fluid antigen (TAEF) as described by Vaz et al. (1997).

Four New Zealand rabbits were immunized 4 times with an inoculum containing 1000µg of each antigen extract on day 0, 14, 21 and 30. Blood was collected via intracardiac after anesthesia with intravenous application of sodium thiopental (20 to 30 mg / kg) and then euthanized with the same drug (40 to 50 mg / kg). Blood samples collected from the ear vein of the rabbits before immunization were used as negative control.

Five female BALB/c mice were immunized with 50µg TAEB or TAEF and aluminum hydroxide adjuvant on day 0 and 21; 21 days latter they received a booster without adjuvant. Cell fusion was performed with immunized mouse spleen cells and NS1 myeloma cells and the fused cells were distributed in 96-well microplates (Köhler and Milstein, 1975; Deffune, 1992). The NS1 myeloma cells were obtained by Köhler

and Milstein (1975) from the Laboratoire de Genie `D Institute National de Transfusion Sanguine (INTS), the Agence Française du Sang, Paris, and maintained in liquid nitrogen (Deffune et al., 1996). The hybridomas that grew up were selected and the supernatants were assayed by indirect ELISA test. The TAEB and TAEF hybridomas that presented high reactivity to the homologous antigens were selected and cloned by limiting dilution (Harlow and Lane, 1988). The clones obtained were assayed by indirect ELISA with the homologue antigens and grown in culture medium for monoclonal antibodies production. The hybridomas and clones produced were frozen (-80°C) in solution fetal bovine (SFB) serum with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO).

The determination of class/subclass of MAbs produced was performed by flow cytometry - CBA Flex (BD Biosciences®), according to manufacturer's instructions and the obtained data were analyzed by Cell Quest software - BD® in “dot plot” graphs.

MAbs injection of cell clones in the peritoneal cavity of BALB /c mice treated with Pristane (Sigma®) was carried out for the highest concentration.

The TAEB and TAEF antigens were separated electrophoretically on a 7,5-20% gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE), following the method described by Laemmli (1970). For western blotting (WB) analysis, antigens were separated on a 12% polyacrylamide gel and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad® - 0,45µm) (Towbin et al., 1979). Membrane was blocked with 5% skimmed milk (Nestlé®) in PBS (0,01M PO₄⁻⁻/0,15M NaCl, pH 7,2) for 18 h, washed in PBS containing 1% skimmed milk, and then incubated for 18 h at 4°C with MAbs or sera diluted 1:10 and 1:100, respectively, in 1% skimmed milk-PBS. After several washes, strips were incubated for 90 min with goat anti-mouse polyvalent (IgG, A, M)-alkaline phosphatase (Sigma®), goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (Sigma®) or rabbit anti-bovine IgG-peroxidase (Sigma®) conjugates. The antigen-

antibody complexes were developed by incubation with 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (Sigma[®]) or 4-chloro-1-naphthol (Sigma[®]).

The indirect immunofluorescence test was performed according Yang & Chung (2004) with modifications: fragments of bovine muscle containing metacystodes were fixed in 10% buffered formalin for 48 h, then embedded in paraplastic and cut into 5µm slices. These slices were subjected to a temperature of 55°C for 4 h and subsequent incubations in xylene and alcohol in different concentrations. The sections were incubated with 4% horse serum to block nonspecific sites for 30 min and subsequently with a purified MAb (IgG) for 1 h at room temperature. After that slides were incubated with anti-mouse polyvalent antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma[®]) diluted 1:50, for 30 min, in the dark. Among all the steps and by the end of the process two washes with PBS were performed. Slides were observed in a fluorescence microscope, with the addition of buffered glycerin. After the reaction of indirect immunofluorescence test, the same sections were subjected to two washes with PBS and stained with Hematoxylin-Eosin.

3. Results and discussion

After cell fusion, the supernatants of hybridoma culture that developed were screened by indirect ELISA and ten TAEB and nine TAEF hybridomas maintained reactivity to homologue antigen and were cloned by limiting dilution, resulting in 50 TAEB clones and 18 TAEF clones. The class/ subclass determined by flow cytometry resulted in 18 IgG1 and 32 IgM TAEB reactive clones and 9 IgG1 and 9 IgM TAEF reactive clones. Because ascite contains higher concentrations of immunoglobulins induction is needed to ensure the usefulness of MAbs in optimization the future ELISA

sandwich. Four TAEB and five TAEF clones were selected for ascitic fluid production (Table 1) and then injected in BALB/c mice and further harvested.

TAEB and TAEF antigens SDS-PAGE electrophoresis presented various bands varying from 6 to 100kDa. Western blotting (WB) was performed to evaluate the antigenic identification by the monoclonal antibodies produced resulting in reactivity to protein fractions of low molecular weight (<18kDa), and also to 43, 55, 66 and 100kDa (Figure 1). Other authors also observed recognition of similar molecular weight antigenic fractions of *Taenia saginata* antigens as the proteins of 155-220kDa, 55, 43 and 30kDa described by Harrison et al. (1989); the ones described by Brandt et al. (1992) with recognition of 87 and 100kDa protein fractions and those observed by Joshua et al. (1990) that were reactive to fractions of 43, 72 and 185kDa. Our results are very promising once these authors suggest that proteins of molecular weight below 20kDa are immunodominant in *Taenia saginata* cysticercosis as well as in *Taenia solium* (Gottstein et al., 1987; Tsang et al., 1989; Yang et al., 1998) or *Taenia crassiceps* (Espindola et al., 2000) and seem to be more interesting for diagnosis purposes.

One TAEB and one TAEF monoclonal antibodies were evaluated by the indirect immunofluorescence test (IFI) and showed recognition of antigens present at both the scolex and the bladder wall (inner and outer wall) of the *Taenia saginata* metadestodes from naturally infected bovine (Fig. 2), but not to the host tissue (Fig. 2 E and F). The proteins secreted in the vesicular fluid were also recognized by these MAbs (Fig 2A and C). Similar results were observed by Harrison et al. (1989) and Yang & Chung (2004), which make this a possibility for diagnosis once recognizes various structure of the cyst.

In conclusion, the production of anti-TAEB and anti-TAEF MAbs with potential usefulness in detecting bovine cysticercosis was successful and can be a useful tool for

monitoring treatment of naturally infected cattle to prevent economic losses and public health injury. In the near future monoclonal antibodies produced will also be tested in samples from human neurocysticercosis patients.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Luiz Carlos Scandarolli for collecting *T. saginata* metacestodes, to Fátima Regina Guimarães and Pedro Luís Florindo for the excellent laboratory assistance, to the Serology Laboratory of Hematology (FMB, Botucatu) for substrate donation and to Dra. Cristina Maria Rodrigues Monteiro for the histological procedures. This work was supported by research grants from FAPESP (08/53723-1). J.C.Vicentini-Oliveira was supported by a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Abuseir, S.; Epe, C.; Schneider, T.; Klein, G.; Kühne, M., 2006 Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal? Parasitology Research 99, 405-409.
- Brandt, J.; Geerts, S.; De Deken, R.; Kumar, V.; Ceulemans, F.; Brys, L.; Falla, N., 1992. A monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. International Journal for Parasitology 22, 471-477.
- Caixeta, L.; Caixeta, M.; Almeida Neto, J.C., 2004. Neurocisticercose: forma psíquica e demência. Revista de Patologia Tropical 33, 33-44.
- Deffune, E. *et al.*, 1996. Manual GMP-BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu, HC, FM, UNESP, 2ª versão, 134.
- Deffune, E., 1992. Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément. Interet in immunohematologie. Paris. Tese Doutorado – Área Imunologia. Universidade Pierre et Marie Curie – VI.
- Draelants, E.; Hofkens, E.; Harding, E.; Brandt, J.; Geerts, S., 1995. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. Research in Veterinary Science 58, 99-100.

- Espíndola, N.M.; De Gaspari, E.N.; Nakamura, P.M.; Vaz, A.J., 2000. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42(3), 175-177.
- Fortes, E., 1997. *Parasitologia Veterinária*. 3ª ed. São Paulo: Ícone.
- Gottstein, B; Zini, D., Schantz, P.M., 1987. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Tropical Medicine and Parasitology* 38, 299-303.
- Harlow, E.; Lane, D., 1988 Eds. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Harrison, L.J.S.; Joshua, G.W.P.; Wright, S.H.; Parkhouse, R.M.E., 1989. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunology* 11, 351-370.
- Joshua, G.W.P.; Harrison, L.J.S.; Sewell, M.M.H., 1990. Protein antigens in the cyst fluid of *Taenia saginata* cysticerci. *Parasitology* 100, 463-467.
- Köhler, G.; Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kyvsgaard, N.C., Ilsoe, B., Henriksen, S.A., Nansen, P., 1990. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. *Research in Veterinary Science* 49, 29-33.
- Laemmli, V.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-684.
- Montenegro, T.C.; Miranda, E.A.; Gilman, R.; The Cysticercosis Working Group in Peru, 1996. Production of monoclonal antibodies for the identification of the eggs of *Taenia solium*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 90, 145-155.
- Neves, D. P.; Melo, A.L.; Linardi, P.M.; Vitor, R.W.A., 1998. *Parasitologia Humana*. 9. ed. São Paulo: Atheneu.
- O.I.E. On line, última atualização em 2004. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Capítulo 2.10.1. Cysticercosis. Acesso em 13 de janeiro de 2009. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00127.htm.
- Onyango-Abuje, J.; Hughes, G.; Opicha, M.; Nginyi, M.K.; Rugutt, K.M.; Wright, H.S.; Harrison, S.J.L., 1996a. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. *Veterinary Parasitology* 61, 221-230.

- Onyango-Abuje, J.; Nginyi, J.M.; Rugutt, M.K.; Wright, S.H.; Lumumba, P.; Hughes, G.; Harrison, L.J., 1996b. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. *Veterinary Parasitology* 64, 177-185.
- Pawlowski, Z., 1982. Taeniasis and cysticercosis. In: Jacobs, L.; Arambulo, R. (Eds). *Parasitic zoonosis*. Boca Raton: C.R.C. Press 1, 313-348.
- Theis, J.H.; Cleary, M.; Syvanen, M.; Gilson, A.; Swift, P.; Banks, J.; Johnson, E., 1996. DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 55, 456-458.
- Towbin, J.; Staehelin, T.; Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 4350-4354.
- Tsang, V.C.W.; Brand, J.A. & Boyer, A.E., 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *The Journal of Infectious Diseases* 159, 50-59.
- Van Kerckhoven, I.; Vansteenkiste, W.; Claes, M.; Geerts, S.; Brandt, J., 1998. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Veterinary Parasitology* 76, 269-274.
- Vaz, A.V.; Nunes, C.M.; Piazza, R.M. F.; Livramento, J.A.; Silva, M.V.; Nakamura, P.M.; Ferreira, A.W., 1997. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57, 354-357.
- Yang, H.J.; Chung, J.Y.; Yun, D.H.; Kong, Y.; Ito, A.; Ma, L.; Liu, Y., 1998. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunology* 20, 483-488.
- Yang, H.J. & Chung, Y.B., 2004. Immunolocalization of the 150kDa protein in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *The Korean Journal of Parasitology* 42, 81-84.

Table 1. Class and subclass of monoclonal antibodies produced against crude (TAEB) and cyst fluid (TAEF) *Taenia saginata* metacestode antigens.

clone	Number of inoculated mice	Volume (mL)	Protein concentration (mg/mL)	Ig class and subclasse
TAEB 1 – 53A4	3	14,5	26,1	IgM
TAEB 2 – 14A1	3	12,2	24,8	IgG ₁
TAEB 2 – 14A2	4	22,3	22,9	IgG ₁
TAEB 4 – 196A4	3	4,0	30,0	IgM
TAEF 2 – 137A1	3	7,3	49,5	IgG ₁
TAEF 2 – 137A6	3	9,3	44,4	IgG ₁
TAEF 2 – 253A5	3	15,9	34,7	IgM
TAEF 2 - 270A2	4	16,0	41,7	IgG ₁
TAEF 3 – 134A3	3	8,2	32,1	IgG ₁

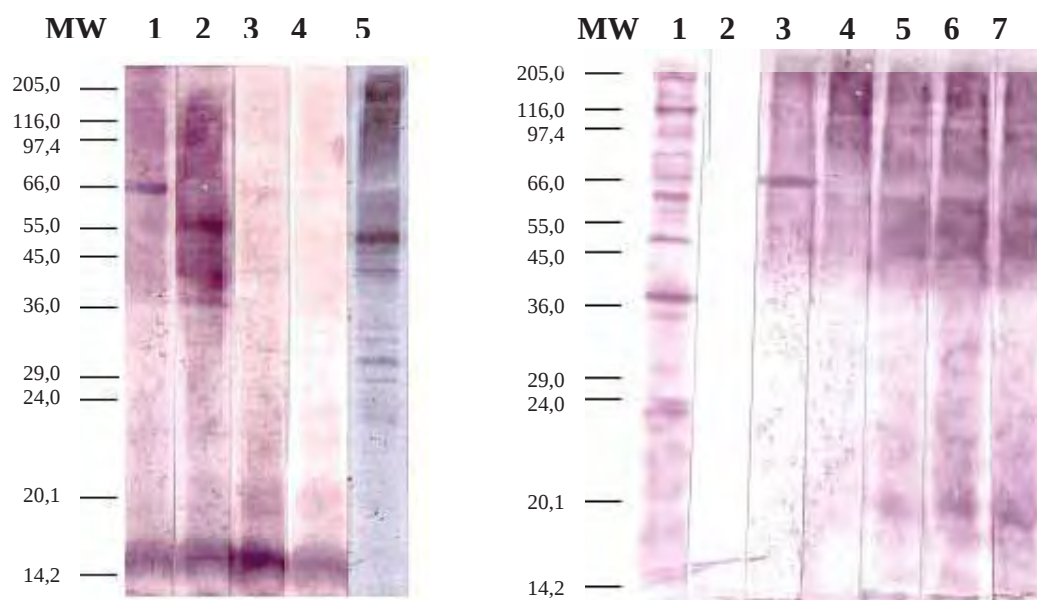


Fig. 1– Western blotting of TAEB (A) and TAEF (B) antigens recognized by IgM (A1, A2, B5) and IgG (A3, A4, B3, B4, B6, B7) monoclonal antibodies against *Taenia saginata*; antibodies from serum of bovine cysticercosis (A5) and policlonal antibodies from serum of rabbit immunized with homologue antigen (B1) non-immunized rabbit (B2). (MW)=Molecular weight marker (Sigma®-S8445).

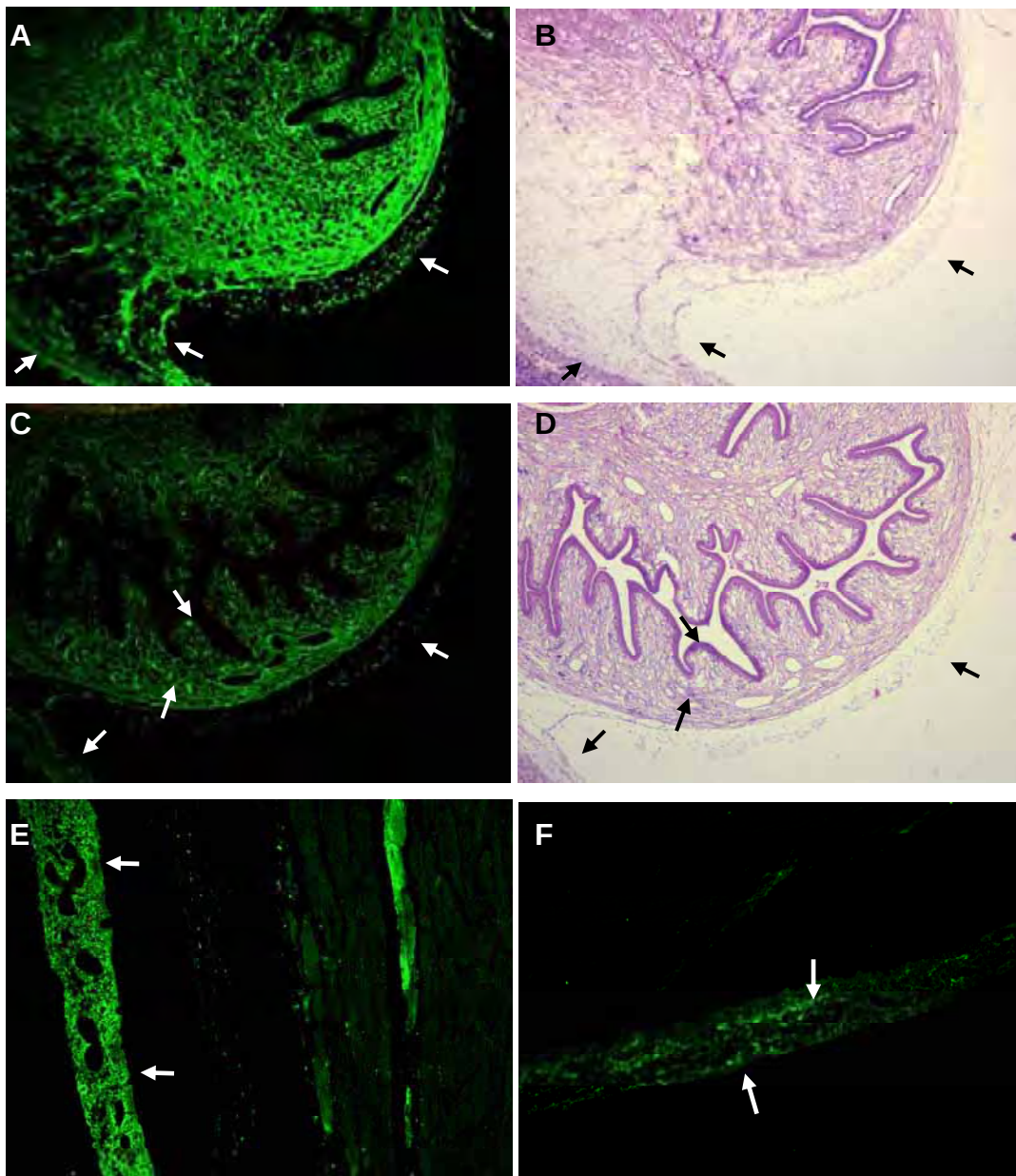


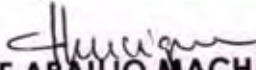
Fig. 2 – Indirect immunofluorescence test of *Taenia saginata* metacestode. IgG monoclonal antibodies against crude and cyst fluid *T. saginata* antigens recognizes antigens present at both scolex (A & C) (x 10) and the bladder wall (E & F) (x 20) of *T. saginata* metacestodes. The same slides hematoxylin-eosin stained (B & D). A, B & E – MAb anti-crude *T. saginata* (TAEB 2 - 14A2); C, D & F – MAb anti-cyst fluid *T. saginata* (TAEF 2 – 270A2).

Anexos

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra antígenos de metacestóides de *Taenia saginata*", Protocolo nº 50/2007-CEEA do(a) Pós-Graduando(a) **Josy Campanha Vincentini**, nível Mestrado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 8 de abril de 2008.


PROF. ASS. DR. LUIZ HENRIQUE DE ARAUJO MACHADO
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

Guide for Authors

Experimental Parasitology

Editorial Office

525 B Street, Suite 1900

San Diego, CA 92101-4495, USA

Tel: (619) 699-6299; Fax: (619) 699-6859

E-mail: ep@elsevier.com

Experimental Parasitology Publisher research papers, research briefs, and capsule reviews on topics that are at the experimental forefront of parasitology.

Submission of Manuscripts

Research papers and briefs are not solicited, but should be submitted to the Editors. Minireviews are invited and topics should be submitted to the Editors for consideration. Manuscripts must be written in English.

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

You will be asked to submit:

- Cover Letter: Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) containing your cover letter to the Editors.
- Response to Reviews (Resubmissions Only): Document (Word, WordPerfect, RTF, PDF, LaTeX) detailing your response to the reviewers' and editor's comments of a previously rejected manuscript that you are resubmitting.
- Manuscript: Single word processing (Word, WordPerfect, RTF) or LaTeX file consisting of the title page, abstract, manuscript text, and any figure/table legends.
- Table: Tables should be separate from the manuscript text, and can be uploaded individually or consolidated into a single file. The file description you input below when uploading your table must include the table number or range (e.g., Table 1, Tables 2-4).

- Figure: Figures should be uploaded individually as TIF or EPS files. The file description you input when uploading your figure must include the figure number (e.g., Fig. 2A).

Please submit the names and addresses, including e-mail addresses, of three to five potential reviewers of their paper to facilitate and accelerate editorial handling. There are no submission fees or page charges.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in *Experimental Parasitology* will be immediately returned to the authors, without detailed review.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Preparation of Manuscripts

Manuscripts should be written in clear, concise, and grammatical English and should be typed with double-spaced lines and wide margins.

All abbreviations used in the body of the manuscript should be defined when they are first used [e.g., deoxyribonucleic acid (DNA)]; only the abbreviation should be used thereafter. Avoid lab jargon abbreviations; use only those that have general usage and genuinely save space.

Language Services. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

The *title page* (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers). If possible, the specific designation of the parasite, followed by a colon, should precede the rest of the title. The common or scientific name of the host should appear at the end of the title (e.g., "*Neoapectana glaseri*: infectivity of clones reared in species isolation of larvae of the insect weevil, *Hylobius pales*"). For Minireviews, the title, as described above, should be preceded by the heading Minireview.

The *abstract* (p. 2) must be a single paragraph that summarizes the main findings of the paper in less than 150 words.

Keywords. A list of keywords and phrases should follow the abstract. They should reflect the contents of the paper accurately and help to describe it to scientific nonexpert readers. The taxonomic designations of all organisms discussed in a manuscript must be included. Larger taxonomic categories should also be mentioned (e.g., in a paper on *Watsonius watsoni*, the term "trematode" should appear as a keyword).

Whenever enzymes are the subject of reporting, the Enzyme Commission (EC) number must be used for accurate identification and retrieval purposes in the *Keywords*.

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced.

Results and *Discussion* may be combined and may be organized into subheadings.

Acknowledgments should be brief and should precede the references. Avoid footnotes. Disclaimers, funding support, and other circumstantial information should be included in the *Acknowledgments* section.

References should be cited in the text by the author's surname and date (e.g., Jones and Smith, 1987), not by number. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Please note the following examples.

Becnel, J.J., 1997. Complementary techniques: preparations of entomopathogens and diseased specimens for more detailed study using microscopy. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Academic Press, San Diego, pp. 337-353.

Eichler, S., Schaub, G.A., 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology* 100, 17-27.

Tanada, Y., 1992. *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals in order of appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and with essential footnotes below.

Figures. Number all figures consecutively with Arabic numerals. Type the legends double-spaced in a list at the end of the manuscript. Figures should be cropped to contain only information relevant to the manuscript. Areas of major interest should not be too close to the edges of the micrograph. Magnifications must be given in the legends *or* a magnification scale bar must be placed within the micrograph and its dimension should be indicated in the legend. Please refer to <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

Color figures. Illustrations in color in print can be accepted only if the authors defray the cost. However, if together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. [Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in

print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.]

Black and white figures for exclusive use as **cover illustrations** may be submitted by authors who are also submitting a manuscript for consideration. These figures do not need to relate to the manuscript being submitted but should relate to the larger scope and focus of *Experimental Parasitology*.

Each figure and table must have a descriptive legend. When figures or tables refer to parasite or host, the name of the organism should be spelled out completely at least once in each legend.

DNA sequences and GenBank accession numbers. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources should type this information in the following manner: For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic* copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of Supplementary Material

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer additional possibilities for publishing supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips, and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com>). To ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article

and supply a concise and descriptive caption for each file. Please note, however, that supplementary material will not appear in the printed journal. For more detailed instructions, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Proofs

PDF proofs will be sent by e-mail to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes should be made, and corrections should be returned promptly.