

## PESQUISA DO ANTÍGENO POLISSACARÍDICO DO *Schistosoma mansoni* EM SOROS DE HAMSTERS PELA TÉCNICA DE IMUNOELETROFORESE CRUZADA

Margareth FERNANDES (1), Ione IRULEGUI (1), Dirce Mary Correia LIMA (1), Clarice Pires ABRANTES (1), Martha Smith CRESSONI (2), Carlos Henrique CHRISTO (1), Luiz Caetano da SILVA (1) & Clovis TAKIGUTI (3).

### RESUMO

A imunoeletroforese cruzada (IEC) foi utilizada para a detecção do antígeno polissacarídico circulante anódico (AgCA) do *Schistosoma mansoni*, livre e complexado, em soro de hamsters infectados. O AgCA foi também pesquisado em soros humanos de 7 pacientes na fase aguda e de 23 na fase crônica da infecção. Foram estabelecidas as condições para isolamento e determinação do AgCA complexado. A sensibilidade da técnica foi aumentada pela incorporação de polietilenoglicol a 2% à agarose e realização da corrida eletroforética a 4°C. O AgCA livre foi detectado em 12 e o complexado em 30 dos 37 soros de hamsters analisados. Foi observada correlação entre AgCA (livre e complexado) e carga parasitária. O AgCA não foi detectado, nas condições experimentais utilizadas, nas amostras de soro humano de 7 pacientes na fase aguda e de 23 na fase crônica da infecção.

**UNITERMOS:** *Schistosoma mansoni*: Imunoeletroforese cruzada (IEC); Antígeno circulante anódico (AgCA) Imunocomplexos (IC).

### INTRODUÇÃO

A presença dos antígenos circulantes do *Schistosoma mansoni* no soro é indicativa de infecção em atividade e sua detecção, conseqüentemente, não só constituiria critério seguro para o diagnóstico inicial como para verificação da persistência da infecção após tratamento quimioterápico.

Na detecção desses antígenos têm sido utilizadas técnicas de precipitação em agarose, fixação de complemento, hemaglutinação, ensaios imunoenzimáticos e radioativos como revisto por QIAN & DEELDER (10), QIAN & WEN (11) e, ainda, SIMPSON & SMITHERS (13). Destas

técnicas, as duas últimas são as mais sensíveis, porém de alto custo, o que impossibilita sua utilização no diagnóstico de rotina.

Dos antígenos circulantes do *S. mansoni* descritos os dois antígenos polissacarídicos, originários do tubo digestivo do verme, têm sido muito estudados com vistas ao estabelecimento de técnicas para sua determinação na circulação do hospedeiro, provavelmente devido à sua grande estabilidade ao calor e por não precipitarem na presença de ácido tricloroacético a 10%, o que facilita seu isolamento das proteínas séricas. O antígeno circulante polissacarídico

Financiado pelo CNPq (PIDE VI) e FAPESP

(1) Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica HC-FMUSP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, CEP 05403 São Paulo, SP., Brasil.

(2) Bolsista Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(3) Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP., Brasil.

Abreviaturas utilizadas: AgCA = antígeno circulante polissacarídico anódico; AgCC = antígeno circulante polissacarídico catódico; IC = Imunocomplexo; IEC = imunoeletroforese cruzada; PEG = Polietilenoglicol.

anódico (AgCA) foi detectado em soro e urina de animais infectados e o antígeno polissacarídico catódico (AgCC) em soro e urina de animais e de humanos infectados, bem como em leite de mães infectadas (10).

A necessidade da utilização de técnicas de baixo custo e simples execução para a determinação dos antígenos circulantes do *S. mansoni* levou-nos, no presente trabalho, à tentativa de aumentar a sensibilidade da imunoelctroforese cruzada (IEC) de LAURELL (7), através da incorporação de polietilenoglicol (PEG) à agarose, bem como da execução desta em câmara refrigerada (4°C). Por serem os dados da literatura, relativos à correlação entre os níveis dos antígenos circulantes e carga parasitária conflitantes (11) pesquisamos, ainda, a possível existência de correlação entre carga parasitária e níveis do AgCA livre e formando imunocomplexos, em hamsters.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Soros de hamsters** — Hamsters infectados por inoculação subcutânea com diferentes números de cercárias do *S. mansoni* foram sangrados pelo plexo orbital 30, 40 e 45 dias após infecção. O número de vermes recuperados na perfusão do fígado e veias mesentéricas com salina contendo 1% de EDTA foi determinado nestes hamsters após os mesmos terem sido sacrificados.

**Soros humanos** — Foram obtidos de 7 pacientes com não mais de seis meses de infecção (fase aguda) e de 23 na fase crônica. Todos eles apresentavam mais de 45 ovos de *S. mansoni* por grama de fezes.

**Antígenos do *S. mansoni*** — O antígeno bruto salino foi obtido por trituração dos vermes adultos liofilizados, em NaCl 0,1%, seguida de agitação por 72 horas a 4°C e centrifugação a 8.500g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi desprezado e o sobrenadante caracterizado quanto ao teor protéico e polissacarídico.

Para obtenção da fração antigênica resistente ao aquecimento, 2ml do antígeno bruto salino foram aquecidos em banho a 100°C para desnaturação e consequente precipitação das proteínas. Após centrifugação, o sedimento foi desprezado

e o sobrenadante, contendo os antígenos polissacarídicos anódico e catódico (4), foi mantido a 4°C até utilização.

O AgCA foi obtido segundo técnica descrita por NASH et al. (4).

**Soro imune anti-*S. mansoni*** — Foi obtido por imunização de carneiros com 3 inoculações subcutâneas do antígeno bruto salino contendo 1,0mg de proteína, seguidas por 3 inoculações, pela mesma via, do AgCA contendo 1,0mg de polissacarídico. Esta série foi repetida por três vezes, num total de 18 inoculações, com intervalos de 14 dias entre as mesmas. A solução do antígeno foi emulsificada com adjuvante completo de Freund na primeira e incompleto nas demais inoculações. A gamaglobulina imune foi obtida a partir do soro imune, por precipitação com sulfato de amônio a 38% de saturação.

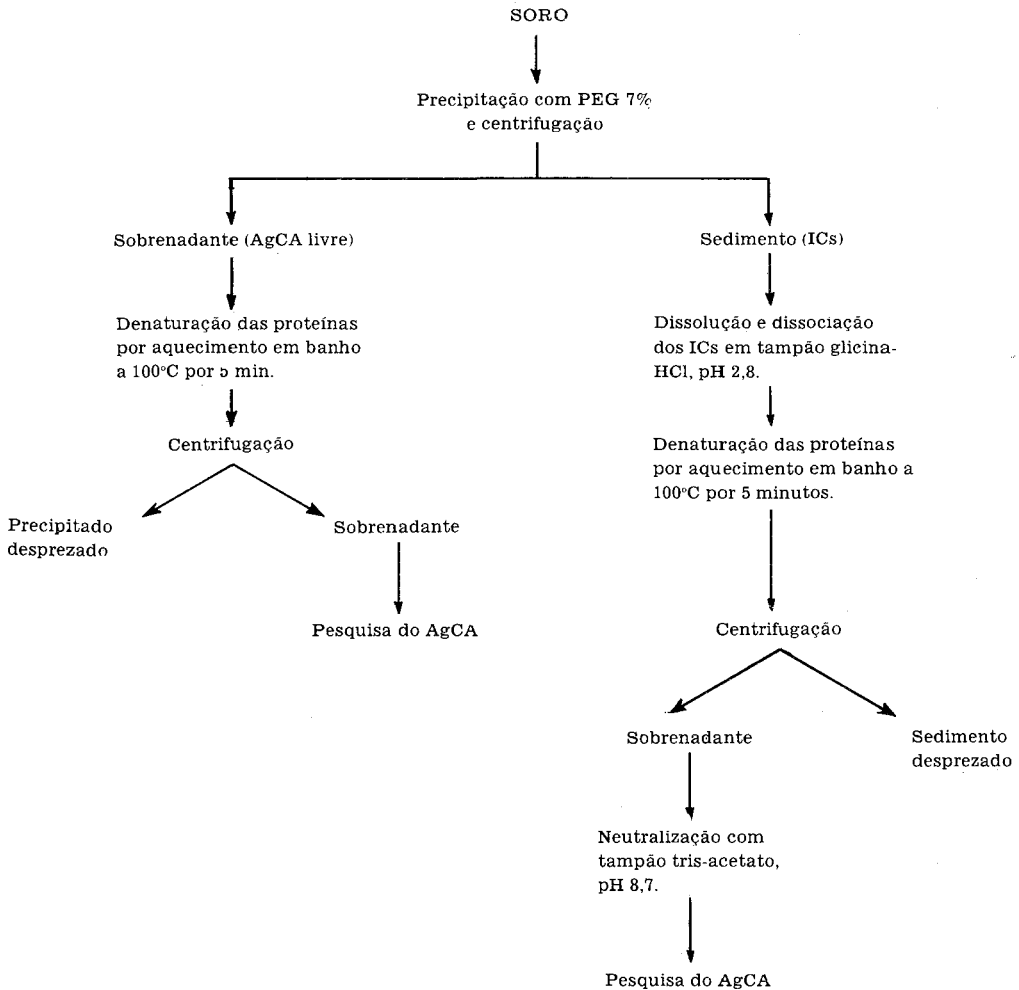
A gamaglobulina imune assim obtida formou, na dupla difusão em ágar, 6 linhas de precipitação contra o antígeno bruto salino e apenas uma linha de precipitação contra soros de hamster colhidos 30 a 45 dias após infecção com o *S. mansoni*, contra AgCA purificado e, ainda, contra a fração antigênica resistente ao aquecimento, adicionada ou não do AgCA. O mesmo número de linhas, formando cones de precipitação, foi observado quando utilizou-se a técnica de IEC, sendo que o cone de precipitação formado por diferentes diluições da solução da AgCA purificado eram nítidos até a diluição de 1/30 do anti-soro na solução de agarose. Destas observações concluímos que, além de reagir com 5 dos antígenos protéicos do verme adulto do *S. mansoni*, o anti-soro obtido reagia com o AgCA, mas não com o AgCC. De fato, foi observado que o AgCC é imunogênico para o hospedeiro infectado, mas não imonogênico quando utilizado para imunização artificial (5,11).

**Precipitação e dissociação dos ICs das amostras de soro** — Utilizando-se o AgCA purificado e ICs preparados com o mesmo, foram estabelecidas as condições ótimas para a separação do AgCA livre do complexado por precipitação com PEG (PM = 6.000), dissociação destes complexos e eliminação, após desnaturação por aquecimento, dos anticorpos dos mesmos. De acordo com estas condições, os soros dos pacientes e

de hamsters infectados foram tratados como descrito a seguir, para posterior determinação do AgCA livre e complexado por IEC. PEG numa concentração final de 7% que, como observamos em experimentos prévios, não precipita o AgCA mas sim os ICs deste, foi adicionado às amostras do soro, sob agitação. Após centrifugação, tanto o precipitado (possivelmente contendo os ICs) redissolvido em tampão glicina-HCl, pH 2,8, co-

mo o sobrenadante foram aquecidos por 5 minutos em banho a 100°C, para denaturação e consequente precipitação das proteínas. As amostras em tampão glicina - HCl foram neutralizadas subsequentemente com tampão tris-acetato de sódio, pH = 8,7. Tanto estas como o sobrenadante da precipitação com PEG 7%, onde pesquisamos o AgCA livre, foram submetidos à IEC (Figura 1).

Fig. 1 — SEPARAÇÃO DO ANTÍGENO POLISSACARÍDICO CIRCULANTE ANÓDICO (AgCA) LIVRE DAQUELE FORMANDO IMUNOCOMPLEXOS (ICs), EM SORO.



**Imunoeletroforese cruzada (IEC)** — Foram utilizadas lâminas revestidas com agarose BIO-RAD de baixa eletroendosse ( $m_r = 0,13 \pm 0,02$ ) a 1%, em tampão TRIS-acetato de sódio (pH = 8,6 e força iônica 0,06), contendo incorpo-

rados 2% de PEG e a fração gamaglobulínica do soro imune anti-*S. mansoni* previamente tratada com PEG 2% na diluição final de 1/30 (V/V).

Foram aplicados 7  $\mu$ l das amostras, em diferentes orifícios de 2 mm de diâmetro feitos na agarose, bem como de uma solução contendo 250  $\mu$ g/ml do AgCA purificado. A corrida eletroforética foi realizada em câmara a 4°C, com uma corrente de 3,6 mA/cm durante 60 minutos, sendo utilizado na cuba o tampão TRIS-acetato de sódio (pH 8,6; força iônica 0,113). Após a corrida, as lâminas foram lavadas com solução de PEG a 2% em NaCl 0,85%, secadas e subsequentemente coradas com uma solução de azul de Coomassie. A distância da ponta do cone de precipitação ao ponto de aplicação da amostra foi determinada com uma ampliação de aproximadamente 8,1 vezes por projeção. A concentração de cada amostra foi determinada com base na concentração da solução padrão do AgCA, aplicada em todas as lâminas.

**Análise estatística** — Para verificar a existência ou não de correlação entre o número de vermes recuperados dos hamsters infectados e

a concentração do AgCA, foi utilizado o teste de correlação de PEARSON (1).

## RESULTADOS

Foram padronizadas nesta investigação as condições de separação do antígeno circulante livre do *S. mansoni* daquele formando ICs, por precipitação destes últimos com PEG, dissociação dos ICs, denaturação dos anticorpos dos mesmos por aquecimento em banho a 100°C e neutralização das amostras, para posterior pesquisa do mesmo por IEC. O procedimento utilizado, de acordo com as condições consideradas ideais, está resumido na Figura 1.

A Figura 2 mostra o aspecto de uma das lâminas de IEC que obtivemos com amostras de soros de hamsters infectados, utilizando tais condições. As menores concentrações detectadas do AgCA, purificado a partir do verme adulto, ficaram em torno de 5-10  $\mu$ g/ml.

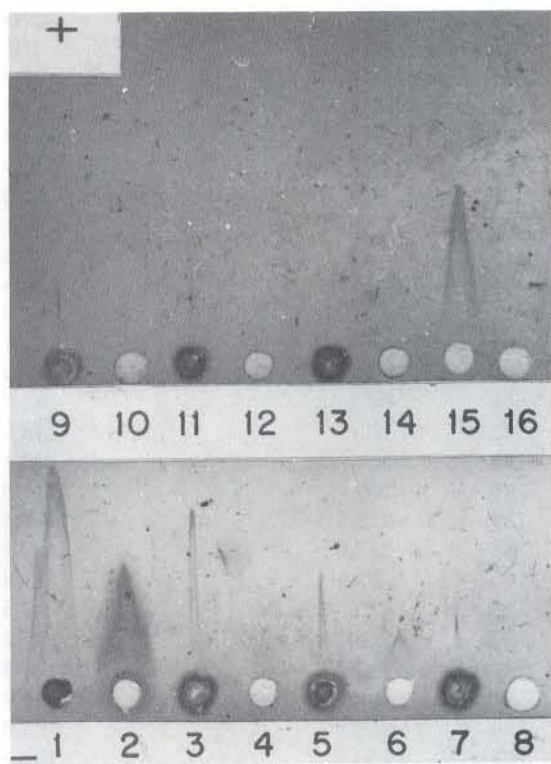
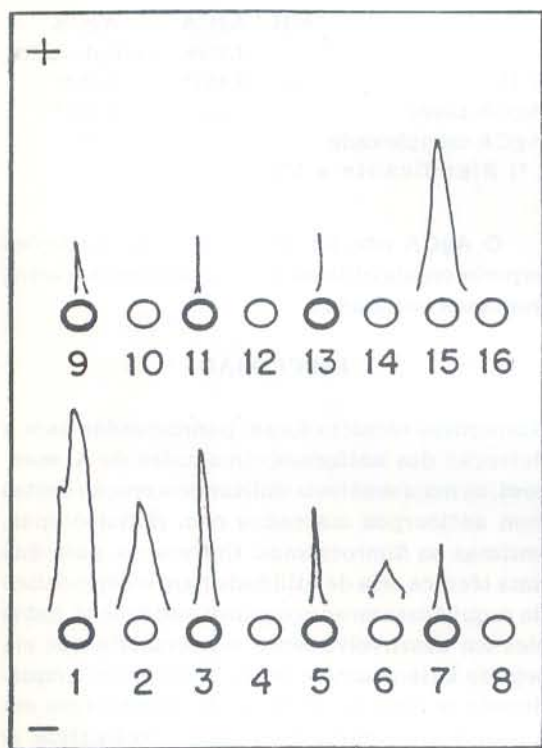


Fig. 2 — Fotografia e representação esquemática de lâmina de imunoelectroforese cruzada (IEC) contendo globulinas imunes anti-antígeno bruto de *S. mansoni* incorporadas à agarose. Nos orifícios pareados 1 e 2; 3 e 4; 5 e 6; 7 e 8; 9 e 10; 11 e 12; 13 e 14 foram aplicados 7  $\mu$ l de sobrenadante e do precipitado, respectivamente, dos soros tratados com PEG a 7% como descrito acima, de diferentes hamsters infectados com *S. mansoni*. O mesmo volume de uma solução de AgCA (250  $\mu$ g/ml) foi colocado no orifício 15 e de soro humano normal no 16.

Os resultados obtidos na determinação, por IEC, do AgCA nos soros de 37 hamsters infectados pelo *S. mansoni* constam da Tabela I. Obser-

TABELA I — Concentração sanguínea do antígeno circulante (AgCA) livre e complexado, em hamsters com diferentes cargas parasitárias do *S. mansoni*.

nº V/H	AgCA (µg/ml)	
	Livre	Complexado
12	ND	ND
20	ND	ND
26	ND	ND
30	ND	7,2
30	ND	14,6
30	ND	99,1
30	ND	148,8
30	162,5	103,3
34	ND	ND
38	ND	224,7
40	ND	ND
40	ND	ND
44	ND	81,7
50	ND	64,3
51	ND	167,3
54	ND	ND
60	ND	65,6
60	77,8	67,1
60	82,2	87,5
64	ND	36,5
76	ND	51,0
80	ND	53,7
80	ND	74,9
80	80,0	43,7
80	ND	126,9
80	ND	128,4
80	ND	214,8
86	218,2	107,4
88	240,0	109,4
100	262,4	119,8
120	81,8	89,5
130	250,0	147,7
140	ND	21,4
145	400,0	164,0
150	109,1	35,8
160	136,3	136,3
200	ND	170,7

Nº V/H = nº de vermes recuperados dos hamsters

ND = não detectado

va-se nela que o AgCA livre ou complexado, foi detectado em todos os hamsters com mais de 54 e em nenhum dos 3 hamsters com menos de 30 vermes e, ainda, que o antígeno livre foi detectado em 32,4% e o complexado em 81,1% das 37 amostras de soro de hamsters infectados. Além disso, detectou-se o AgCA livre somente nas amostras em que o AgCA complexado foi detectado. Os soros de 5 hamsters não infectados não apresentaram cone de precipitação na IEC.

Os coeficientes de correlação calculados a partir dos valores indicados na Tabela I encontram-se na Tabela II. As correlações entre AgCA (livre e complexado) e carga parasitária em hamsters, tomados dois a dois, foram significantes ao nível de 5%.

TABELA II — Matriz de coeficientes de correlação (r) entre as variáveis AgCA (livre e complexado) e carga parasitária (V/H) em hamsters.

V/H	V/H	AgCA Livre	AgCA complexado
	—	0,457*	0,390*
AgCA Livre	—	—	0,337*
AgCA complexado	—	—	—

(\*) Significante a 5%

O AgCA não foi detectado, nas condições experimentais utilizadas, em qualquer dos soros humanos analisados.

## DISCUSSÃO

Numerosas técnicas foram padronizadas para a detecção dos antígenos circulantes do *S. mansoni*, as mais sensíveis utilizando a reação destes com anticorpos marcados com radioisótopos, enzimas ou fluorocromos. Entretanto, para que uma técnica seja de utilidade para o diagnóstico da esquistossomose nos países endêmicos, todos eles em desenvolvimento, é necessário que ela seja de baixo custo e de fácil execução, enquadrando-se aqui as técnicas de precipitação em agarose e de hemaglutinação. DEELDER & EVELEIGH (3) utilizaram a hemaglutinação indireta para a detecção do AgCA do *S. mansoni* em soro de hamsters e obtiveram uma boa sensibilidade, detectando o antígeno em diluições de até 20 ng/ml.

As técnicas de precipitação são menos sensíveis. Apesar do aumento da sensibilidade que obtivemos no presente trabalho, de 100 para 5-10 µg/ml, na detecção do AgCA, pela introdução de pequenas modificações na técnica de IEC, esta é ainda muito baixa, se comparada à de hemaglutinação indireta.

Utilizamos, para isolamento e dissociação dos ICs, procedimento semelhante ao descrito por DEELDER et al (6), com modificações na concentração do PEG utilizado na precipitação dos ICs e no tempo de aquecimento para desnaturação das proteínas. SANTORO et al. (12) separaram anticorpos anti-*S. mansoni* dos ICs formados por estes anticorpos com antígenos circulantes do parasita, por precipitação dos ICs com PEG 7%. De fato, observamos que esta concentração de PEG não precipita o AgCA livre, mas somente os ICs formados por estes. Observamos, ainda, que o aquecimento em banho a 100°C para desnaturação das proteínas, em pH ácido, por mais de 5 minutos provoca a degradação parcial do AgCA, razão pela qual não prolongamos o mesmo por mais tempo. Com as proteínas seria também desnaturado, se presente, o antígeno circulante protéico designado por "antígeno-4" (2), deixando na amostra apenas os dois antígenos polissacarídicos, anódico e catódico, resistentes ao aquecimento. Destes, apenas o último foi encontrado em fluidos biológicos humanos (10, 11). Como o anti-soro que utilizamos não reage com este antígeno, nossos resultados negativos com os soros humanos são coerentes com os dados da literatura.

Como MITCHELL & CRUISE (8) enfatizam, a técnica ideal para o imunodiagnóstico da esquistossomose seria aquela que fornecesse, entre outras, informação sobre a carga parasitária do hospedeiro. Os dados existentes na literatura, sobre correlação entre concentração dos antígenos circulantes e carga parasitária são conflitantes (10). Em relação ao AgCA do *S. mansoni*, DEELDER et al (5) não observaram correlação entre carga parasitária e os níveis do mesmo em hamsters e camundongos, enquanto no presente estudo observamos correlação entre estes dois parâmetros. Esta discrepância pode ser devida à utilização de técnicas diferentes na detecção do AgCA.

A presença do AgCA livre observada principalmente no soro de hamsters com alta carga parasitária (> 80V/H) é, provavelmente devida à insuficiência de anticorpos específicos para complexar os altos níveis do AgCA liberado para a circulação pelos vermes.

As dificuldades na determinação dos antígenos circulantes do *S. mansoni* em fluidos biológicos humanos, resultantes de seus baixos níveis nas infecções naturais e da falta de resposta imune com formação de anticorpos à imunização de animais com o AgCC, presente em fluidos biológicos de pacientes infectados, talvez concorram para o aparente desinteresse atual dos pesquisadores, que se reflete no reduzido número de trabalhos publicados mais recentemente no sentido de se chegar a uma técnica simples mas sensível de detecção dos antígenos circulantes do *S. mansoni*, para fins diagnósticos.

## SUMMARY

### Detection of circulating polysaccharide antigen of *Schistosoma mansoni* in hamster sera by crossed immunoelectrophoresis.

Crossed immunoelectrophoresis (IEC) was used for detection of free and complexed circulating polysaccharide anodic antigen (AgCA) of *Schistosoma mansoni* in sera of infected hamsters. An attempt was also done to detect AgCA in human sera from patients infected with *S. mansoni*.

The conditions for isolation and detection of complexed AgCA were established. The sensitivity of IEC was increased by incorporation of 2% polyethylene glycol (PEG) to the agarose and by maintaining the system at 4°C during the electrophoretic run.

Free AgCA was detected in 12 and the complexed in 30 of the 37 hamsters sera analysed. Correlation between AgCA (free and complexed) and the parasite load was observed. AgCA was not detected, under the experimental conditions used, in human sera from 7 patients in the acute and 23 in the chronic phase of infection.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Dr. Giovanni Gazzinelli, do Centro de Pesquisa René Rachou (Belo Horizonte) pelo fornecimento de 200 mg de vermes liofilizados do *S. mansoni*, bem como à Dra. Jun-ko Takano Osaka, Chefe do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento dos animais de laboratório utilizados no presente trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P. & GOTLIEB, S. L. D. *Bioestatística*. São Paulo, E. P. U., 1981. p. 104.
2. BOUT D.; SANTORO, F.; CARLIER, Y.; BINA, J. C. & CAPRON, A. Circulating immune complexes in schistosomiasis. *Immunology*, 33: 17-22, 1977.
3. DEELDER, A. M. & EVELEIGH, C. P. — An indirect haemagglutination reaction for the demonstration of *Schistosoma mansoni* circulating anodic antigen *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 72: 178-180, 1978.
4. DEELDER, A. M.; KLAPPE, H. T. M.; VAN DEN AARDWEG, G. J. M. J. & VAN MEERBEKE, E. H. E. M. — *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters *Exp. Parasit.*, 40: 189-197, 1976.
5. DEELDER, A. M.; KORNELIS, D.; VAN MARCK, E. A. E.; EVELEIGH, P. C. & VAN EGMOND, J. G. — *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamsters and human infection. *Exp. Parasit.*, 50: 16-32, 1980.
6. DEELDER, A. M.; VAN DALEN, D. P. & VAN EGMOND, J. G. — *Schistosoma mansoni*: microfluorometric determination of circulating anodic antigen and antigen-antibody complexes in infected hamster serum. *Exp. Parasit.*, 44: 216-224, 1978.
7. LAURELL, C. B. — Electroimmuno assay. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 29 (Suppl. 124): 21-37, 1972.
8. MITCHELL, G. F. & CRUISE, K. M. — Schistosomiasis: antigens and host-parasite interactions. In: PEARSON, T. W., ed. — *Parasite antigens: toward new strategies for vaccines*. New York, Marcel Dekker, 1986. p. 275-316.
9. NASH, T. E.; PRESCOTT, B. & NEVA, F. A. — The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.*, 112: 1500-1507, 1974.
10. QIAN, Z. L. & DEELDER, A. M. — Circulating antigens in *Schistosoma* - infections *Acta Leidensia*, 49: 71-80, 1982.
11. QIAN, Z. L. & WEN, H. C. — Schistosome circulating antigens (CSA) as a possible diagnostic parameter for active infections. *Acta Leidensia*, 51: 37-52, 1983.
12. SANTORO, F.; PRATA, A.; CASTRO, C. N. & CAPRON, A. — Circulating antigens, immune complexes and C<sub>3</sub>d levels in human schistosomiasis: relationship with *Schistosoma mansoni* egg output. *Clin. exp. Immunol.*, 42: 219-225, 1980.
13. SIMPSON, A. J. G. & SMITHERS, S. R. — Schistosomes: surface, egg and circulating antigens *Curr. top. Microbiol. Immunol.*, 120: 205-239, 1985.

Recebido para publicação em 27/11/1987.