FABIANA CRUZ GOMES DA FONSECA PAPAVERO

Análise de anticorpos antiparasitários
dosados em soro sanguíneo
e sua relação com a presença de bandas
oligoclonais
em pacientes com Esclerose Múltipla

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências
Programa de: Neurologia
Orientador: Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado

São Paulo

2013

DEDICATÓRIA

A meus pais, pelo exemplo de seriedade, dedicação à vida e a formação da família. Exemplos de luta, doação, amor e respeito. Pelo apoio irrestrito.

A meus irmãos, pelo amor e companheirismo em minha trajetória.

A meu marido, pela dedicação, incentivo, carinho, cumplicidade e principalmente pela compreensão nas minhas inevitáveis e frequentemente imprevisíveis ausências, participando ativamente do meu processo de realização profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor doutor Antônio Spina França Neto (*in memoriam*) pela oportunidade de aprimoramento que generosamente me ofereceu.

A meu orientador, Doutor Luís dos Ramos Machado, professor do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo enorme auxílio, pela amizade, pelo conhecimento e pelos ensinamentos que sempre me ofereceu com tamanha generosidade. Meu eterno agradecimento.

Ao Professor Doutor José Antônio Livramento, professor do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança, pela amizade e por todos os conhecimentos que contribuíram para minha formação.

À Professora Doutora Adelaide José Vaz (*in memoriam*) pela colaboração na realização dos testes imunológicos, tornando possível responder às questões laboratoriais atinentes ao tema desta Dissertação.

A Darcy Terezinha Borges e Camila Caroline de Sena, técnicas do LIM-15 (Laboratório de Investigação Médica em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), pela colaboração na execução das técnicas e pelo empenho e dedicação.

À amiga Márcia de Azevedo, pelos valiosos auxílios e incentivo.

Aos colegas do LIM 15 pelas contribuições e pela ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Neurologia pelo apoio amigo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes que participaram deste estudo e seus familiares, meu respeito e agradecimento.

EPIÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Divisão de Biblioteca e Documentação. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia da A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão da Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Esclerose Múltipla	17
1.2. Esclerose Múltipla e Bandas Oligoclonais.....	19
1.3. A Esclerose Múltipla e a Hipótese Higiênica.....	21
1.4. Hipótese Higiênica e doenças parasitárias.....	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODO.....	28
3.1. Casuística do material-fonte.....	29
3.2. Metodologia utilizada.....	31
3.3. Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Identificação dos anticorpos por antígenos LV-Tcra.....	38
4.2. Identificação dos anticorpos por antígenos ES-Tcra.....	39
4.3. Relação entre as presenças de BOC no LCR com Ac anti- <i>taenia</i>	40
4.4. Relação entre ocorrência ou não de BOC no LCR e anticorpos parasitários anti- <i>Taenia</i>	42
5. DISCUSSÃO.....	45
5.1. Anticorpos antiparasitários específicos para o complexo teníase- cisticercose e ocorrência de BOC.....	47
5.2. Anticorpos antiparasitários inespecíficos e ocorrência de BOC em pacientes com EM.....	48

5.3. Anticorpos antiparasitários específicos e inespecíficos em pacientes com EM em relação aos pacientes do grupo controle	49
5.4. A baixa prevalência de BOC no grupo de pacientes que compõem esta casuística e a ocorrência de anticorpos antiparasitários.	50
6. CONCLUSÕES.....	51
7. ANEXOS.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	56

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

USP	Universidade de São Paulo
BOC	Bandas Oligoglonais
EM	Esclerose Múltipla
LV-Tcra	Antígeno de Líquido Vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>
ES-Tcra	Antígeno de Excreção e Secreção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
NC	Neurocisticercose
IB	<i>Imunoblotting</i>
CIS	Síndrome Clinicamente Isolada
RM	Ressonância Magnética
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
SCN	Sistema Nervoso Central
FIE	Focalização Isoelétrica
DNI	Doenças Neurológicas Inflamatórias

Lista de figuras

Figura 1 – IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno LV-Tcra com Controle Positivo (C ⁺), Controle Negativo (C ⁻) e algumas amostras de soros dos pacientes.....	38
Figura 2 – IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES-Tcra 180 com Controle Positivo (C ⁺), Controle Negativo (C ⁻) e algumas amostras de soros dos pacientes.....	39

Lista de tabelas

Tabela 1 – Frequências absolutas de anticorpos contra os antígenos ES-Tcra e LV-Tcra, de acordo com o peso molecular em pacientes com e sem bandas oligiglonais nos diversos grupos de doentes estudados..... 40

Tabela 2 – Frequências relativas (%) de anticorpos contra os antígenos ES-Tcra e LV-Tcra, de acordo com o peso molecular em pacientes com e sem bandas oligiglonais nos diversos grupos de doentes estudados..... 41

Resumo

Papavero, FCGF. **Análise de anticorpos antiparasitários dosados em soro sanguíneo e sua relação com a presença de bandas oligoclonais em pacientes com esclerose múltipla.** [Monografia]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introdução: A frequência de detecção de bandas oligoclonais (BOC) em doentes com esclerose múltipla (EM) na cidade de São Paulo é significativamente mais baixa do que em outras cidades do Brasil e de outros países, principalmente da Europa e da América do Norte. Não se conhece o motivo pelo qual isso ocorre. Uma das hipóteses mais interessantes relacionada à imunopatogenia da EM é a chamada Hipótese Higiênica, que postula uma relação inversamente proporcional entre a prevalência de infecções por parasitas e a frequência da EM. **Objetivo:** verificar se há relação entre a ocorrência de anticorpos contra parasitas no soro sanguíneo e a detecção de BOC em pacientes diagnosticados com EM na cidade de São Paulo. **Métodos:** Foram estudados 164 pacientes do Ambulatório de Doenças Desmielinizantes da Divisão de Neurologia Clínica e da Divisão de Anestesia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo dos quais foram obtidas as amostras de LCR e de soro em que foi realizado este estudo. Esses pacientes foram separados em 4 grupos (EM, CIS, Grupo Controle com Pacientes de DNI e Grupo Controle com Pacientes sem Queixas Neurológicas) nos quais foram identificadas as presenças de BOC e de anticorpos parasitários. Para a detecção de anticorpos parasitários, foi utilizada a técnica de eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo, com antígenos LV-Tcra (líquido vesicular de *Taenia crassiceps*) e ES-Tcra (líquido excreção/secreção de *Taenia crassiceps*). **Resultados:** Dos 164 pacientes estudados, separados em seus respectivos grupos, foram pesquisados anticorpos antiparasitários de baixo e de alto peso molecular. Esses anticorpos foram observados em 103 pacientes nos quais não havia

BOC. Destes, 2 apresentaram anticorpos de baixo peso molecular e 59 anticorpos de alto peso molecular. Dos 61 pacientes em que havia BOC, foram encontrados anticorpos de baixo peso molecular em um; 16 apresentaram anticorpos de alto peso molecular. **Conclusão:** Em doentes com EM clinicamente definida anticorpos anti-*Taenia* foram detectados com a mesma frequência em pacientes com BOC e em pacientes sem BOC.

Palavras-chave: hipótese higiênica; esclerose múltipla,; bandas oligoclonais; antígenos do líquido vesicular da *Taenia crassiceps*; antígenos do líquido excreção/secreção de *Taenia crassiceps*..

Summary

Papavero, FCGF. **Analysis of Antiparasitic Antibodies Measured In Blood Serum and their Relationship with the Presence of Oligoclonal Bands in Patients with Multiple Sclerosis.** [Monograph]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Introduction: The frequency of oligoclonal bands (OCB) detection in patients with multiple sclerosis (MS) in the city of São Paulo is significantly lower than in other cities of Brazil and other countries, mainly Europe and North America. To date, the reason for its occurrence is still unknown. One of the most interesting hypotheses related to the immunopathogenesis of MS is the so-called Hygiene Hypothesis, which postulates an inverse relationship between the prevalence of parasitic infections and the frequency of MS.

Objective: This study examined whether there is a relationship between the occurrence of antibodies against parasites in blood serum and the detection of OCB in patients diagnosed with MS in the city of São Paulo. **Methods:** We have studied 164 patients from the Demyelinating Diseases Clinic of the Division of Clinical Neurology and Division of Anesthesia Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo from whom CSF and serum samples were obtained and which were used to conduct the present study. These patients were divided into 4 groups: MS, Clinically Isolated Syndrome (CIS), control group with patients with Inflammatory Neurologic Diseases (IND) and Control Group with patients without neurologic complaints, in whom the presence of OCB and anti-parasitic antibodies was identified. For the detection of parasitic antibodies, the unidimensional electrophoresis of proteins in polyacrylamide gel in a batch system with LV-Tcra antigens (*Taenia crassiceps* vesicular fluid) and ES-Tcra (net excretion / secretion of *Taenia crassiceps*) was used. **Results:** Of the 164 patients studied, separated into their respective groups, anti-parasite antibodies of low and high molecular weight were analyzed. A total of 103 patients presented no OCB, and of these, 2 had antibodies of low

molecular weight and 59 presented antibodies of high molecular weight. Of the 61 patients with OCB positive, one showed antibodies of low molecular weight and 16 antibodies of high molecular weight. **Conclusion:** This study showed that in patients with clinically established MS. anti-*Taenia* antibodies occurred with the same frequency in patients with OCB and in patients without OCB.

Key words: hygiene hypothesis; multiple sclerosis; oligoclonal bands; *Taenia crassiceps* vesicular fluid antigens; excretion/secretion of *Taenia crassiceps* antigens.

1. Introdução

1. Introdução

1.1. Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica do Sistema Nervoso Central (SNC), imunomediada e de caráter desmielinizante.(Poser e McDonald, 1998; Reiber, 1998; Link e Huang, 2006).

Paralelamente às lesões desmielinizantes, podem ocorrer fenômenos degenerativos de células do sistema nervoso, que podem existir desde as fases iniciais, mas que se acentuam progressivamente, podendo ser observados nos exames de neuroimagem (Ribeiro *et al.*, 2010). Alguns pesquisadores especulam se essas lesões degenerativas antecedem ou são consequência do processo inflamatório (Gama *et al.*, 2009).

O quadro histopatológico da doença caracteriza-se pela presença de placas de desmielinização localizadas na substância branca, preferencialmente no cérebro, em região periventricular, nos nervos ópticos e também da medula espinhal. Quando a doença está em atividade, observa-se nas placas a presença de infiltrado inflamatório perivascular constituído de células imunocompetentes. Macrófagos, células T, células B, e plasmócitos estão presentes junto às lesões inflamatórias (Correale e Molinas, 2002), usualmente relacionadas a alterações funcionais.

Embora a causa etiológica da EM não seja conhecida, sua manifestação pode ocorrer com maior frequência em indivíduos geneticamente suscetíveis (GAMA *et al.*, 2009), podendo ser desencadeada por um ou mais agentes ambientais (La Flamme *et al.*, 2004).

O primeiro marco importante para a caracterização clínica da doença data de 1983, quando Poser e colaboradores estabeleceram os critérios diagnósticos da EM. Os critérios de Poser estabelecem clara prioridade para as manifestações clínicas em que predominam as alterações da motricidade,

visuais e da coordenação motora. Frequentemente, há acometimento encefálico e medular, com múltiplos locais do sistema nervoso acometidos simultaneamente. Alterações do exame de líquido cefalorraquidiano (LCR) também têm papel de destaque, principalmente a imunoprodução local e a presença de bandas oligoclonais.

O segundo marco deveu-se à sistematização do uso da imagem pela ressonância magnética (RM) para identificar e acompanhar as lesões desmielinizantes na EM (Lan-Peixoto *et al.*, 2002).

Atualmente, os exames auxiliares mais importantes são a RM e o LCR. Enquanto as técnicas de imagem são de particular importância para demonstrar lesões características e comprovar a disseminação dessas lesões no tempo e espaço, o LCR continua sendo importante ferramenta para demonstrar a ocorrência de processo inflamatório crônico no SNC, com características compatíveis com EM. Além disso, o estudo do LCR também permite afastar o diagnóstico de outras doenças passíveis de inclusão entre os diferenciais da EM (Gama *et al.*, 2009).

Numerosos estudos da prevalência da EM foram publicados nos últimos 50 anos, como parte de uma tentativa de definir melhor a distribuição da doença (Callegaro *et al.*, 2001).

A frequência da EM na população mundial apresenta-se maior em países de latitudes mais afastadas do Equador, como, por exemplo, Europa Oriental, Inglaterra, Canadá e Nova Zelândia. Estas regiões têm frequência mais elevada do que as situadas em áreas Equatoriais, como a África, América do Sul e Sudeste da Ásia, que têm uma frequência baixa (La Flamme *et al.*, 2004).

A EM parece ser relativamente rara na América do Sul, em comparação com os países do hemisfério norte (Ribeiro *et al.*, 2010).

O Brasil, país de extensão continental, com características ambientais e sócio-econômicas diversas é considerado também uma área de baixa ocorrência da EM. Além disso, sua população é composta de etnias variadas concentradas em diferentes regiões. Desta forma, assume-se que a

frequência de EM pode variar de região para região, pois ambos os fatores podem ser determinantes. (Lana-Peixoto *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2010; Fragoso e Peres, 2007).

1.2. Esclerose Múltipla e Bandas Oligoclonais

Investigações dos componentes humorais presentes no LCR oferecem possibilidades de elucidação do fenômeno imunológico local *in vivo* em pacientes com esclerose múltipla.

Estes achados, juntamente com a presença de bandas oligoclonais (BOC) no LCR, sugerem uma etiologia imunomediada para a EM (Correale e Molinas, 2002). Além do aumento do número de células frequentemente observado em pacientes com EM, há duas avaliações laboratoriais clássicas para caracterizar o caráter imunomediado da EM: a determinação de alterações qualitativas dessas imunoglobulinas, através da pesquisa de BOC realizada simultaneamente no LCR e no soro (Freedman *et al.*, 2005) e a determinação quantitativa de imunoglobulinas (Correale e Molinas, 2002).

Não se conhecem ainda os mecanismos imunológicos precisos que resultam no aparecimento de bandas oligoclonais nos pacientes com esclerose múltipla ou em pacientes com outras alterações inflamatórias crônicas do sistema nervoso central. Este assunto não será considerado neste estudo por não fazer parte de seus objetivos.

Alguns métodos têm sido descritos para demonstração das BOC no LCR. O mais utilizado é a focalização isoelétrica (FIE) aplicada à corrida eletroforética. Essa técnica consiste na variação do gradiente do pH obtido pela aplicação de anfólitos ao longo do gel que suporta essa corrida eletroforética. As proteínas vão correr eletroforéticamente até encontrarem seu ponto isoeletroforético, ocasião em que param de migrar (Correale e Molinas, 2002).

A especificidade das IgGs oligoclonais na EM é desconhecida (Correale e Molinas, 2002; Link e Huang, 2006; Yu *et al.*, 2011) as BOC são

também encontradas em doenças crônicas infecciosas do SNC como neurosífilis, neurotuberculose, neurocriptococose, neurossarcoidose e panencefalite esclerosante subagudas, entre outras.

A frequência de detecção de BOC restritas ao LCR em pacientes com EM varia amplamente em diferentes populações (Gama *et al.*, 2009) provavelmente relacionada a variações na apresentação clínica nos diversos estudos, a bases genéticas de populações diferentes, e a diferentes técnicas de análise empregadas, o que pode levar a diferentes resultados.

Estudo recente em pacientes com EM da cidade de São Paulo, Brasil, demonstrou ocorrência de BOC em 54,4% nos pacientes com EM. Esta taxa é substancialmente mais baixa do que a descrita nas populações caucasianas da Europa e da América do Norte, nas quais são registradas BOC em 90 a 95% dos pacientes com EM. Por outro lado, os valores observados nos pacientes da cidade de São Paulo se aproximam dos descritos em outras áreas, como China, Japão, Líbano e Índia, em que as BOC são encontradas entre 30 e 60% (Gama *et al.*, 2009).

As BOC costumam persistir por toda a vida dos pacientes, uma vez detectadas. Estas bandas estão relacionadas à produção de anticorpos da classe IgG por clones específicos de células estáveis, originadas de provavelmente de eventos inflamatórios ou infecciosos ocorridos no passado. Habitualmente não há nenhuma relação entre estes anticorpos e a etiologia da EM, sendo denominados “anticorpos inocentes” (Yu *et al.*, 2011).

Além das BOC, é frequente observar a síntese intratecal de IgG nos pacientes com EM, o que permite caracterizar uma alteração quantitativa na síntese ou na liberação dessas imunoglobulinas no interior do sistema nervoso, e isso pode ser relevante na patogenia da doença.

Níveis elevados de IgG com imunoprodução local no LCR são vistos mais frequentemente em pacientes que evoluem de modo mais agressivo do que em pacientes na fase inicial da doença. Paralelamente, a doença costuma apresentar-se com menor gravidade quando os níveis de IgG estão baixos e não há imunoprodução local.

1.3. A Esclerose Múltipla e a Hipótese Higiênica

A prevalência da esclerose múltipla varia amplamente nas diversas regiões do mundo. Os motivos pelos quais existe essa diferença não são conhecidos.

Uma das hipóteses mais aceitas atribui ao meio ambiente um papel relevante na manifestação clínica da doença. Acredita-se que fatores ambientais possam contribuir para mudanças no repertório imunológico das pessoas e no tipo de resposta suscitada por fatores potencialmente patogênicos.

Recentemente vem ganhando destaque a chamada “Hipótese Higiênica” (Correale e Farez, 2007). Trata-se de uma hipótese análoga àquela já aceita no campo dos estudos sobre fenômenos relacionados às doenças alérgicas. O postulado principal dessa teoria admite que, à medida que países com menor desenvolvimento foram melhorando suas condições sócio-econômicas e diminuindo a prevalência das suas doenças parasitárias endêmicas, haveria, numa proporção inversa, uma elevação na frequência de doenças auto-imunes ou imunomediadas.

Mudanças no estilo de vida das pessoas que vivem nos países industrializados causaram uma diminuição das doenças infecciosas e estão associadas ao aumento de doenças alérgicas e auto-imunes de acordo com a Hipótese Higiênica. Strachan, em 1989, observou haver uma correlação inversa entre a ocorrência da febre do feno e o número de irmãos mais velhos, após fazer acompanhamento com mais de 17.000 crianças britânicas nascidas em 1958. Hoje, a Hipótese Higiênica está ainda mais em voga devido ao acúmulo de observações confirmatórias de sua credibilidade não somente no caso das doenças atópicas, mas também nas doenças inflamatórias auto-imunes (Okada *et al*, 2010).

Por exemplo: a incidência da EM é maior em países de alta latitude (países ocidentais desenvolvidos) do que em regiões equatoriais. Não somente os residentes dos países ocidentais, mas também os imigrantes

dos países em desenvolvimento, têm um risco maior de desenvolver doenças inflamatórias intestinais e asma. No caso do diabetes tipo 1 é observada uma distribuição geográfica semelhante à registrada no caso das doenças acima e uma correlação inversa em relação da Hipótese Higiênica (Carvalho *et al.*, 2008).

A revolucionária “Hipótese Higiênica” tem recebido numerosas contribuições e modificações por parte de diferentes pesquisadores no campo epidemiológico, das ciências clínicas e da imunologia (Sotgiu *et al.*, 2007).

Durante as últimas décadas houve de fato um acúmulo de evidências epidemiológicas, indicando aumento regular da incidência de doenças auto-imunes em países desenvolvidos. Foram propostas como a causa do aumento dessas doenças naquelas populações tanto as melhorias nas condições sanitárias de forma geral quanto a redução da prevalência de doenças infecciosas (Correale *et al.*, 2008) . Esse fenômeno não se observa claramente em países menos desenvolvidos.

Além disso, ainda nos países desenvolvidos, têm sido registradas diferenças na prevalência de doenças auto-imunes entre áreas urbanas e rurais (Correale e Farez, 2007).

A associação entre uma exposição reduzida a agentes infecciosos como parte da mudança do estilo de vida e a alta prevalência da hipersensibilidade de doenças auto-imunes parecem estar baseadas em evidências consistentes. No entanto, o mecanismo desta associação ainda não está elucidado, podendo ser atribuído a um desvio imunológico ou a uma alteração do mecanismo imune regulatório (Sotgiu *et al.*, 2007).

Apesar dessas evidências, o registro de valores percentuais menores de pacientes com EM e BOC em países não-europeus ou nos EUA, permanece sem explicação convincente. Exemplo eloquente disto são os resultados obtidos por Diniz e colaboradores na cidade de São Paulo.

1.4. Hipótese Higiênica e doenças parasitárias

Muitos estudos demonstraram que infecções causadas por helmintos diminuem o risco de doenças auto-imunes ou alérgicas (Carvalho *et al.*, 2008).

Correale *et al.* demonstraram que pacientes com EM infectados por helmintos apresentaram um decréscimo significativo do número de recidivas, menores pontuações na tabela incapacidade da EM e menor atividade significativa da doença, demonstrada pela RM em comparação com os pacientes de EM não infectados (Correale *et al.*, 2008).

Dentre as parasitoses mais frequentes em países em desenvolvimento, o complexo teníase-cisticercose tem posição de destaque. Sua distribuição é universal sendo mais frequente nos países em desenvolvimento na América Latina, África e Índia. (Bueno *et al.*, 2000).

A eventual relação entre doenças inflamatórias de tipo imunomediado que acometem o sistema nervoso e a infecção humana pelo complexo teníase-cisticercose ainda não foi estudado.

A detecção de anticorpos anti-*Taenia* no soro é prejudicada pelas reações cruzadas com outras parasitoses e requer o uso de antígenos purificados (Bueno *et al.*, 2000). A preparação adequada dos extratos de antígeno de *Taenia* em quantidades suficientes para o diagnóstico da neurocisticercose (NC) ainda depende da disponibilidade de suínos naturalmente infectados com larvas de *T. solium*, geralmente criados em condições inadequadas e difíceis de localizar.

O uso de peptídeos sintéticos do cisticerco da *T. solium* foi descrito e esta estratégia poderia fornecer antígenos suficientes para os ensaios diagnósticos (Bueno *et al.*, 2001). No entanto, seu uso é limitado devido à tecnologia utilizada no ensaio, ao alto custo e à complexidade e duração do processo de purificação do antígeno. Entretanto, é possível utilizar uma estratégia alternativa: outras espécies de *Taenia* compartilham antígenos com a *Taenia solium*. A cepa ORF da *T. crassiceps* representa um

importante modelo experimental que, de acordo com exaustivos estudos comparativos, permite a utilização no imunodiagnóstico da NC (Bueno *et al.*, 2001).

Assim, extratos antigênicos de cistos de *T. crassiceps* e sua reatividade cruzada com antígenos dos cistos de *T. solium* faz com que a *T. crassiceps* seja uma fonte de antígenos alternativa interessante para o diagnóstico e investigação imunológica de cisticercos (Espindula *et al.*, 2005).

O fluido vesicular de *T. crassiceps*, em particular, foi usado de forma eficaz no diagnóstico da cisticercose. Em especial, as frações 18 – 14 KDa da *T. crassiceps*, têm sido consideradas específicas para o diagnóstico imunológico da NC usando ensaios de *imunoblotting*. Peptídeos de alto peso molecular, por outro lado, foram associados a reatividade cruzada quando analisadas amostras sorológicas de seres humanos e de suínos (Espindula *et al.*, 2005).

Mesmo utilizando antígenos purificados, é possível detectar, em grande parte das amostras, a presença de anticorpos inespecíficos de alto peso molecular. De acordo com Ishida *et al.*, as frações maiores que 30-kDa ocorrem, entre outras parasitoses, em toxocaríase, esquistossomose e hidatidose (Ishida *et al.*, 2003).

Desta forma, as frações menores que 30-kDa são específicas para o imunodiagnóstico da NC e as de alto peso molecular são caracterizadas como inespecíficas e dirigidas a um “pool” de antígenos parasitários (Espindula *et al.*, 2005).

Pesquisas recentes mostraram que a esquistossomose pode oferecer proteção contra o desenvolvimento de algumas doenças imunomediadas não infecciosas, permitindo estabelecer algum vínculo potencial com o que preconiza a “hipótese higiênica”. O mecanismo preciso responsável por essa proteção não é conhecido, podendo mesmo diferir de acordo com doenças específicas. Vários estudos têm demonstrado que a exposição a componentes específicos de *Schistosoma mansoni* (ovos e ou antígenos dos

vermes) podem oferecer proteção ao hospedeiro. Fica claro, por esses estudos, que as alterações nas respostas imunes inatas e no desenvolvimento da regulação das respostas imunoadquiridas possuem papéis críticos na supressão das doenças imunomediadas na vigência de infecção pela esquistossomose. É portanto possível que, pelo conhecimento dos mecanismos mediante os quais esses componentes inibem a doença, haja novas perspectivas de compreensão dos fenômenos envolvidos nas doenças imunomediadas como a EM, por exemplo (La Flamme *et al.*, 2004).

2. Objetivo

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho é estudar:

(1) a frequência de anticorpos antiparasitários específicos para o complexo teníase-cisticercose no soro sanguíneo em pacientes com esclerose múltipla que apresentam bandas oligoclonais em relação àqueles que não apresentam essas bandas;

(2) a frequência de anticorpos antiparasitários inespecíficos de alto peso molecular no soro sanguíneo nesses mesmos grupos de pacientes;

(3) a frequência de anticorpos antiparasitários no soro sanguíneo em pacientes com esclerose múltipla em comparação a pacientes do grupo controle.

3. Material e Método

3. Material e Método

3.1. Casuística do material-fonte

O presente estudo laboratorial foi realizado em material excedente (soro sanguíneo coletado de pacientes com esclerose múltipla residentes na cidade de São Paulo, submetidos ao estudo de bandas oligoclonais restritas ao líquido cefalorraquidiano (Gama *et al.*, 2009)). Esse estudo foi realizado no Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e na Divisão de Neurologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o Protocolo de Pesquisa nº 0185/10. Anexo I.

Tratando-se de amostras previamente coletadas, não foi aplicado, por desnecessário, o Termo de Consentimento Livre e Informado.

Os 164 pacientes dos quais foram obtidas as amostras utilizadas neste estudo provieram do Ambulatório de Doenças Desmielinizantes da Divisão de Neurologia Clínica e da Divisão de Anestesia do HCFMUSP.

Esses pacientes haviam sido divididos em quatro grupos:

Grupo 1: Pacientes com EM, em suas quatro formas clínicas - 90 pacientes;

Grupo 2: Pacientes que apresentaram o primeiro episódio clínico indicativo de evento desmielinizante ou síndrome clinicamente isolada (CIS) - 16 pacientes;

Grupo 3: Grupo controle de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias (DNI) - 39 pacientes (Neste grupo foram excluídos pacientes com neurocisticercose);

Grupo 4: Grupo controle de pacientes sem queixas neurológicas, admitidos na clínica cirúrgica e que se submeteram a pequenas cirurgias que exigiram anestesia raquidiana - 19 pacientes.

Os critérios de inclusão e de exclusão dos pacientes dessa casuística foram descritos por Gama *et al.* (2009).

Nas amostras de LCR e de soro desses pacientes estudados por Gama, foi realizado o estudo da migração eletroforética das frações protéicas do LCR e do soro por Focalização Isoelétrica (FIE), simultaneamente e no mesmo suporte físico, seguida de *immunoblotting*, (Gama *et al.*, 2009). Esse é o método de eleição utilizado atualmente para pesquisa de BOC nos centros de pesquisa e de diagnóstico mais avançados em todo o mundo.

A leitura do material para identificação das BOC foi feita por método qualitativo, sendo caracterizada como presente (+) ou ausente (-). Foram utilizados critérios rigorosos para reduzir ao mínimo possível o viés subjetivo relacionado ao examinador, conforme descrito por Gama *et al.* (2009).

Esta metodologia de estudo da ocorrência de BOC em LCR e soro foi utilizada por pesquisadores de grande experiência no assunto, pertencentes ao Laboratório de Investigação Médica em Neurologia – LIM 15 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os testes de validade para calcular a sensibilidade e a especificidade do método de detecção de BOC nesses pacientes, assim como a estatística descritiva relacionada a gênero, etnia e formas clínicas da EM foram referidos por Gama *et al.* (2009).

Após o término da pesquisa de BOC, as amostras de LCR e soro utilizadas na FIE foram armazenadas em *freezer* a -20°C .

3.1.1. Frequência dos achados de BOC nos pacientes estudados

O referente estudo revelou que:

- Dos 90 pacientes com EM, 49 apresentaram BOC (54,4%) no LCR;
- Dos 16 pacientes com CIS, 5 apresentaram BOC (31,3%) no LCR;
- Dos 39 pacientes com DNI, 7 apresentaram BOC (17,9%) no LCR;
- Dos 19 pacientes sem doenças neurológicas, nenhum dos indivíduos apresentou BOC.

3.2. Método

Por ocasião do início deste estudo, as amostras disponíveis foram criteriosamente avaliadas quanto à viabilidade e quanto ao volume disponível para análise.

Para este método foi utilizado somente o soro sanguíneo.

A sensibilização do gel por extratos antigênicos de *Taenia crassiceps*, assim como a identificação dos anticorpos contra antígenos parasitários nas amostras, foram realizadas na Cidade Universitária, no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

3.2.1. Sensibilização do gel por extratos antigênicos de *Taenia crassiceps*

Os extratos antigênicos utilizados foram: líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* (LV-Tcra) (Vaz *et al.*, 1997) e o líquido de excreção e secreção de cisticercos de *T. crassiceps* produzidos em tempo de 180 minutos (ES-Tcra 180) (Espindola *et al.*, 2002), cedidos gentilmente

pela Profa. Dra. Adelaide José Vaz, *in memoriam*, à época docente da Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, de acordo com declaração em Anexo II.

Os extratos antigênicos LV-Tcra e ES-Tcra 180 foram separados através de eletroforese unidimensional de proteínas em gel de poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio (SDS-PAGE) em sistema descontínuo (Laemmli, 1970).

Foram utilizados em todas as corridas dois controles, um positivo e um negativo.

Para a montagem do gel de separação, foi preparado um suporte utilizando placas de vidro com dimensões de 9,5 x 9,5 cm, sobrepostas entre espaçadores com 1mm de espessura nas extremidades laterais e superior da placa. As extremidades foram vedadas e as placas presas com grampos de metal.

Para a preparação do gel de poliacrilamida em gradiente foram utilizados dois géis com diferentes percentagens de acrilamida (gel de acrilamida a 7% - polímero com uma malha mais grossa e a 20% - polímero com uma malha mais justa).

Os géis foram preparados com acrilamida 30%, bis-acrilamida (N, N'-methylenebisacrylamide), trizma base 1,5 molar (pH 8,8), sulfato duodecil de sódio (SDS) 20% e água bidestilada q.s.p. com quantidades diferentes dos reagentes de acordo com a porcentagem do gel utilizado.

Após a mistura dos reagentes para os géis, foram adicionados aos dois persulfato de amônio e TEMED (N,N,N',N'-tetrametileno-etilenediamina); devido à rápida polimerização do gel, colocaram-se rapidamente as soluções nas placas de vidro até atingir uma altura de 5,5cm na montagem das placas.

As soluções foram colocadas nas placas de forma que o gel viesse a formar um sistema descontínuo de poliacrilamida.

Antes de colocar o gel de empilhamento, esperou-se o gel de acrilamida polimerizar, gotejando sobre ele o volume de 1 cm de água bidestilada, para evitar que houvesse evaporação do gel. O gel foi mantido “overnight” para aguardar a sua polimerização completa.

Retirou-se a água do gel de separação por meio de inversão.

Foi preparado o gel de empilhamento (*Stacking*) a 5% utilizando acrilamida 30%, bis-acrilamida, Trizma base 0,5M (pH 6,8), SDS 20% e água bidestilada q.s.p. de acordo com a concentração do gel de empilhamento.

Adicionou-se persulfato de amônio e TEMED à solução do gel de empilhamento. O topo do gel de separação foi lavado com esta solução e colocou-se rapidamente esta solução próxima ao topo das placas. A seguir foi inserido o pente na solução, cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas na solução.

O tempo de polimerização foi de 30 a 60 minutos.

Antes da utilização dos antígenos, foi necessário prepará-los de acordo com a capacidade de orifícios por pente. Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra (Trizma 60mM (pH 6,8), glicerol 25%, SDS 2%, , 2-mercaptanol 14,4mM, azul de bromofenol e água bidestilada).

Após realizada a diluição para os antígenos ficarem na mesma concentração, estes foram submetidos a aquecimento em banho de água fervente durante 5 minutos.

Para a corrida do gel, preparou-se a cuba enchendo o seu compartimento inferior com o tampão de corrida pH 8,8 preparado com Trizma 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1% e água destilada q.s.p. Foi retirado o espaçador da extremidade inferior da placa e a mistura vedante foi limpa com papel de filtro.

Mergulhou-se a placa no tampão da cuba, retirando as bolhas da extremidade inferior com o auxílio de uma seringa.

Retirou-se cuidadosamente o pente, encheu-se o compartimento superior da cuba com tampão de corrida e, com o auxílio de uma seringa de

Hamilton, foram introduzidos os antígenos (LV-Tcra e ES-Tcra) nos orifícios com volumes constantes (de acordo com o tamanho do pente), preenchendo os espaços vazios com tampão de amostra diluído.

A corrida foi realizada utilizando uma amperagem constante de 120mA e uma voltagem de 60V até a passagem do antígeno do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 150V, sendo interrompida quando o azul de bromofenol (Pharmacia Biotech, Suíça) migrou pela distância de 1 cm a partir do final do gel.

Para melhorar a caracterização, foi realizado *immunoblot* (IB) após a corrida eletroforética dos antígenos através da transferência dos peptídeos separados por SDS-PAGE do gel para a membrana de nitrocelulose 0,2 μ (Millipore, EUA) de acordo com a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979).

Para realizar a transferência dos antígenos foi montado um sistema úmido utilizando uma bandeja contendo tampão de transferência, preparado com Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20% (pH 8,3) e água destilada. Nessa bandeja foi mergulhado um suporte de acrílico perfurado e forrado por uma esponja tipo “scotch brite”.

Foram colocadas 3 folhas de papel de filtro n° 1, seguidas de 1 folha de papel de filtro n° 3, membrana de nitrocelulose, o gel, 1 folha de papel de filtro n° 3, 3 folhas de papel de filtro n° 1 e, por último, cobriu-se com a esponja e o suporte de acrílico, evitando a formação de bolhas.

Esse suporte foi montado e colocado verticalmente na cuba eletroforética de transferência com o tampão e o gel voltados para o cátodo e a membrana virada para o ânodo.

A transferência foi realizada a uma voltagem constante de 50V a 4°C, “overnight”. Ao término da transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S 0,5% (Serva Feinbiochemical, GmbH e Co. KG, Alemanha) e o gel com “Coomassie blue”, para testar a qualidade da transferência.

A membrana foi descorada com água destilada, coberta com papel-filme de PVC.

Para a realização da reação imunoenzimática, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura e acondicionadas em compartimentos apropriados para a revelação imunoenzimática.

3.2.2. Identificação dos anticorpos contra antígenos parasitários

Para o procedimento de imunodeteção, as tiras foram depositadas em compartimentos apropriados, lavadas com PBS (Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,025M e NaCl 0,14M, pH 7,2) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T). O bloqueio dos sítios livres remanescentes na membrana foi feito com 1 ml de solução bloqueadora a 5% (leite desnatado e trissalina com pH 7,5) por compartimento, deixando sob agitação leve, constante, durante 2 horas e à temperatura ambiente.

As amostras dos soros dos pacientes foram diluídas em leite desnatado a 1%, obtendo-se uma concentração de 1/50.

A solução bloqueadora foi desprezada e 1 ml do soro dos pacientes foi adicionado ao compartimento, tendo sido colocado em agitação leve e constante à 4°C, “overnight”. Ao término, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos cada uma com trissalina (tris-hydroxymethylaminoethane 0,01M e NaCl 0,15M pH 7,4).

Após as lavagens, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) previamente diluído (1:1500 em leite desnatado a 5%), durante 1 hora, sob agitação constante, a temperatura ambiente. Ao término da incubação, foram realizadas 3 lavagens em PBS-T por 10 minutos cada uma.

Para revelar as bandas reativas dos antígenos, foi adicionado 1 ml de solução cromógena, composta por 4-cloro-1-naftol (Sigma), dissolvidos em metanol e trissalina pH 7,5 e 30% de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) por

compartimento, mantendo-se o sistema sob agitação constante até à revelação das bandas.

A reação enzimática foi interrompida com várias lavagens em água destilada e secas entre folhas de papel de filtro.

3.3. Análise estatística

De acordo com os tipos de variáveis estudadas, nas categóricas dicotômicas foi utilizado o teste Qui-Quadrado (χ^2) para estudar a possível associação entre variáveis qualitativas. Quando a frequência das variáveis não permitiu o uso do teste do Qui-Quadrado (χ^2), foi utilizado o teste exato de Fisher.

Ficou estabelecido o valor de $\alpha = 0,05$, mantendo-se o mesmo critério da análise estatística realizada no trabalho de Gama *et al.*, 2009.

4. Resultados

4. Resultados

Foram pesquisados anticorpos parasitários anti-*Taenia* no soro dos pacientes estudados utilizando dois tipos de antígenos: o LV-Tcra (líquido vesicular – *T. crassiceps*) e o ES-Tcra (excreção e secreção *T. crassiceps*) 180, classificados qualitativamente de acordo com a presença de anticorpos de baixo e de alto peso molecular.

4.1. Identificação dos anticorpos por antígenos LV-Tcra

A figura 1 ilustra a corrida em *immunoblot* (IB) para pesquisa da reatividade dos anticorpos anti-*Taenia crassiceps* utilizando antígenos LV-Tcra.

Na primeira fase foram analisados anticorpos de baixo peso molecular para proteínas abaixo de 30-KDa. Quando apresentam reatividade com as frações 14- e 18-KDa, são considerados específicos para neurocisticercose (NC).

Figura 1. IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno LV-Tcra com Controle Positivo (C⁺), Controle Negativo (C⁻) e algumas amostras de soros dos pacientes.

Na segunda fase foi estudada a presença de anticorpos para proteínas com alto peso molecular, habitualmente presentes em pacientes com outras parasitoses. O IB mostrou que havia, nas amostras estudadas, reatividade com proteínas de 71-, 54- e 45-KDa.

4.2. Identificação dos anticorpos por antígenos ES-Tcra 180

A figura 2 ilustra o IB da corrida para pesquisa de reatividade dos anticorpos anti-*Taenia crassiceps* utilizando antígenos ES-Tcra.

Também neste caso, na primeira fase, foi feita a análise qualitativa para a identificação de pacientes com NC, pesquisando a reatividade com as frações 18- e 14-KDa. A seguir, numa segunda fase, foram pesquisados anticorpos para outras parasitoses. O IB mostrou que havia reatividade de anticorpos com o antígeno ES 180 para as proteínas 71-, 54- e 45-KDa.

Figura 2. IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES-Tcra180 com Controle Positivo (C⁺), Controle Negativo (C⁻) e algumas amostras de soros dos pacientes.

4.3. Relação entre a presença de BOC no LCR e os anticorpos anti-*Taenia*

A Tabela 1 mostra os resultados encontrados para anticorpos de baixo e de alto peso molecular. A Tabela 2 consta os mesmos resultados expressos em valores percentuais.

Tabela 1. .Frequências absolutas de anticorpos contra os antígenos ES-Tcra e LV-Tcra, de acordo com o peso molecular em pacientes com e sem bandas oligoclonais nos diversos grupos de doentes estudados.

GRUPOS		n	Presença de Ac	n baixo peso	n alto peso
90 Pacientes com EM	BOC -	41	Ac anti- <i>Taenia</i> +	1	13
	BOC +	49	Ac anti- <i>Taenia</i> +	1	11
16 Pacientes com CIS	BOC -	11	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0	5
	BOC +	5	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0	3
39 do Grupo Controle com Pacientes de DNI	BOC -	32	Ac anti- <i>Taenia</i> +	1	10
	BOC +	7	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0	2
19 do Grupo Controle com Pacientes sem Queixas Neurológicas	BOC -	19	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0	7

Legenda: EM, esclerose múltipla; CIS, síndrome clinicamente isolada; DNI, doenças neurológicas inflamatórias; BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos.

Tabela 2. .Frequências relativas (%) de anticorpos contra os antígenos ES-Tcra e LV-Tcra, de acordo com o peso molecular em pacientes com e sem bandas oligoclonais nos diversos grupos de doentes estudados.

GRUPOS		N	Presença de Ac	n baixo peso	n alto peso
90 Pacientes com EM	BOC -	45,6%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	2,4%	31,7%
	BOC +	54,4%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	2%	22,4%
16 Pacientes com CIS	BOC -	68,7%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0%	45,4%
	BOC +	31,3%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0%	60%
39 do Grupo Controle com Pacientes de DNI	BOC -	82%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	3,1%	31,2%
	BOC +	18%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0%	28,6%
19 do Grupo Controle com Pacientes sem Queixas Neurológicas	BOC -	100%	Ac anti- <i>Taenia</i> +	0%	36,8%

Legenda: EM, esclerose múltipla; CIS, síndrome clinicamente isolada; DNI, doenças neurológicas inflamatórias; BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos.

4.4. Relação entre a ocorrência ou não de BOC no LCR e anticorpos parasitários anti-*Taenia*

No grupo esclerose múltipla (EM), os pacientes com BOC apresentaram anticorpos anti-*Taenia* com frequência semelhante àquela encontrada em pacientes sem a presença de BOC.

Tabela 3. Relação dos pacientes com EM com BOC e sem BOC x anticorpos específicos (baixo peso molecular).

	Ac+	Ac-	TOTAL
BOC+	1	48	49
BOC-	1	40	41
TOTAL	2	88	90

p = 0,898 (NS)

Legenda: BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos; NS, não significante.

Tabela 4. Relação dos pacientes com EM com BOC e sem BOC x anticorpos inespecíficos (alto peso molecular).

	Ac+	Ac-	TOTAL
BOC+	13	28	41
BOC-	11	38	49
TOTAL	24	66	90

p = 0,323 (NS)

Legenda: BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos; NS, não significante.

Constatação semelhante pode ser feita no grupo com síndrome clinicamente isolada (CIS) quando se estudou a presença de anticorpos anti-parasitários em relação à presença ou ausência de BOC.

Tabela 5. Relação dos pacientes com CIS com BOC e sem BOC x anticorpos inespecíficos (alto peso molecular).

	Ac+	Ac-	TOTAL
BOC+	5	6	11
BOC-	3	2	5
TOTAL	8	8	16

p = 0,590 (NS)

Legenda: BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos; NS, não significante.

No grupo com doenças neurológicas inflamatórias (DNI) também não houve diferença significativa quando se consideraram os pacientes com e sem BOC em relação à presença de anticorpos anti-parasitários.

Tabela 6. Relação dos pacientes do Grupo DNI com BOC e sem BOC x anticorpos específicos (baixo peso molecular).

	Ac+	Ac-	TOTAL
BOC+	1	31	32
BOC-	0	7	7
TOTAL	1	38	39

p = 0,636 (NS)

Legenda: BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos; NS, não significante.

Tabela 7. Relação dos pacientes do Grupo Controle com DNI com BOC e sem BOC x anticorpos inespecíficos (alto peso molecular).

	Ac+	Ac-	TOTAL
BOC+	10	22	32
BOC-	2	5	7
TOTAL	12	27	39

p = 0,889 (NS)

Legenda: BOC, bandas oligoclonais; ac, anticorpos; NS, não significante.

5. Discussão

5. Discussão

Serão discutidos os seguintes itens:

(1) anticorpos antiparasitários específicos para o complexo teníase-cisticercose e ocorrência de BOC;

(2) anticorpos antiparasitários inespecíficos de alto peso molecular e ocorrência de BOC;

(3) anticorpos antiparasitários específicos e inespecíficos em pacientes com esclerose múltipla em relação aos pacientes do grupo controle;

(4) a baixa prevalência de BOC no grupo de pacientes que compõe esta casuística e a ocorrência de anticorpos antiparasitários.

5.1 Anticorpos antiparasitários específicos para o complexo teníase-cisticercose e ocorrência de BOC

Anticorpos antiparasitários específicos no soro sanguíneo foram encontrados com frequência semelhante em pacientes com esclerose múltipla nos quais havia BOC e naqueles em que não havia BOC.

O postulado central da Hipótese Higiênica se refere à menor ocorrência de doenças imunomediadas, como a esclerose múltipla, em pacientes de países menos favorecidos quanto às condições sócio-econômicas. Esse postulado, *sensu stricto*, não estabelece nenhuma Hipótese em relação à ocorrência de BOC em populações já acometidas por esclerose múltipla e sua eventual relação com a caracterização de doenças parasitárias humanas.

Em nosso estudo, considerou-se a possibilidade de a teníase-cisticercose poder desempenhar esse hipotético papel protetor uma vez que a região de onde provieram os pacientes desta casuística é endêmica para essa parasitose.

Essa Hipótese não foi confirmada. Podemos, portanto, afirmar que a presença de anticorpos antiparasitários não modificou a ocorrência de BOC em pacientes com esclerose múltipla.

5.2 Anticorpos antiparasitários inespecíficos e ocorrência de BOC em pacientes com esclerose múltipla.

Anticorpos antiparasitários inespecíficos no soro sanguíneo foram encontrados com frequência semelhante em pacientes com esclerose múltipla nos quais ocorriam BOC em relação àqueles em que não havia BOC.

Por considerarmos que o complexo teníase-cisticercose pudesse ser por demais particular e restrito para desempenhar um efeito tão importante quanto aquele a que se refere a Hipótese Higiênica, estudamos anticorpos inespecíficos, de alto peso molecular, relacionados a uma série de parasitas prevalentes na população estudada e que, classicamente, exerceriam papel protetor do hospedeiro.

Essa Hipótese também não foi confirmada. Também neste caso, a frequência de BOC em pacientes com esclerose múltipla não foi afetada pela ocorrência de anticorpos antiparasitários inespecíficos de alto peso molecular.

5.3 Anticorpos antiparasitários específicos ou inespecíficos em pacientes com esclerose múltipla em relação aos pacientes do grupo controle

O conjunto de anticorpos antiparasitários, específicos ou não, estudados no soro sanguíneo apresentou frequência semelhante em pacientes com esclerose múltipla e em pacientes do grupo controle.

Na seleção do grupo controle para este estudo evitou-se cuidadosamente a inclusão de pacientes com doenças imunomediadas ou a elas potencialmente relacionadas.

Portanto, fica claro que a Hipótese que relaciona a ocorrência de doenças imunomediadas à menor frequência de parasitoses não pôde ser comprovada neste estudo.

Evidentemente, não há uma relação estrita entre a ocorrência de parasitoses e a detecção de anticorpos antiparasitários. Algumas parasitoses podem não induzir a produção de anticorpos. Há, portanto, a possibilidade de que a Hipótese Higiênica seja relacionada a um grupo mais restrito de parasitas, cujo diagnóstico não seria baseado na detecção de anticorpos no soro sanguíneo.

Essa possibilidade pode ter sido a causa dos resultados obtidos com os pacientes incluídos neste estudo. Nesse caso, haveria a necessidade de utilizar metodologia específica que, entretanto, não é postulada claramente nos estudos que propugnam a aceitação da Hipótese Higiênica.

5.4 A baixa prevalência de BOC no grupo de pacientes que compõem esta casuística e a ocorrência de anticorpos antiparasitários.

Não é possível atribuir a baixa frequência de BOC na casuística de Diniz e colaboradores à presença de anticorpos antiparasitários no soro sanguíneo desses pacientes.

É provável, por isso, que a baixa prevalência de BOC observada nessa casuística esteja relacionada a mais de um fator, eventualmente com graus diferentes de influência no resultado final. É necessário considerar que a região da qual provieram as amostras representa o perfil típico das grandes metrópoles em desenvolvimento, com intensas variações e desigualdades, frutos de correntes migratórias internas e externas e com elevado grau de miscigenação racial. Desse modo, é difícil considerar quem pertence a um grupo sócio-econômico ou quem não pertence a ele, sem admitir gradações diferentes em cada domínio, nem sempre passíveis de quantificação.

É possível que a Hipótese Higiênica não desempenhe um papel causal tão direto ou ao menos tão linear como lhe é atribuído, nem na frequência de observação de BOC nem na ocorrência da doença esclerose múltipla.

Em resumo, a ocorrência semelhante e igualmente distribuída de anticorpos antiparasitários nos diversos grupos estudados neste estudo não corrobora uma formulação tão simples quanto aquela postulada por muitos em relação à Hipótese Higiênica. No dizer de Sotgiu *et al.*, 2007, a “Hipótese Higiênica” continua a propor numerosas questões ainda a serem investigadas quanto à natureza dos agentes protetores infecciosos, ao tempo do seu envolvimento em relação ao curso natural das doenças em pauta e, o mais importante, quanto aos mecanismos de proteção que os agentes infecciosos, por si sós, poderiam desencadear contra as doenças auto-imunes.

6. Conclusões

6. Conclusões

1. Anticorpos antiparasitários específicos para o complexo teníase-cisticercose no soro sanguíneo ocorrem com frequências semelhantes em pacientes com esclerose múltipla quando estes apresentam bandas oligoclonais ou quando estas bandas não são detectadas;
2. Anticorpos antiparasitários inespecíficos de alto peso molecular no soro sanguíneo ocorrem com frequências semelhantes em pacientes com esclerose múltipla quando estes apresentam bandas oligoclonais ou quando estas bandas não são detectadas;
3. Anticorpos antiparasitários no soro sanguíneo ocorrem com frequências semelhantes em pacientes com esclerose múltipla e em pacientes do grupo controle.

7. Anexos

Anexo I – Parecer da Comissão de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/08/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0185/10**, intitulado: **"RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE BANDAS OLIGOCLONAIS NO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E ANTICORPOS PARASITÁRIOS ANTI-TAENIA "** apresentado pelo Departamento de **NEUROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. Luiz dos Ramos Machado**

Pesquisador (a) Executante: **Fabiana Cruz Gomes da Fonseca**

CAPPesq, 12 de Agosto de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP, da FIMUSP, Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo R. Ovidio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6449 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcfmusp.br / secretariacappesq2@hcfmusp.br

Anexo II – Declaração

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Laboratório de Imunologia Clínica**DECLARAÇÃO**

Eu, PROFA. DRA. ADELAIDE JOSÉ VAZ, docente da Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, declaro ter participado ativamente do projeto "RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE BANDAS OLIGOCLONAIS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO E ANTICORPOS PARASITÁRIOS *ANTI-TAENIA*", protocolo de pesquisa HCFMUSP número 0185/10, processando as amostras de material incluídas no referido projeto, sendo Fabiana Cruz Gomes da Fonseca a pesquisadora executante e Luís dos Ramos Machado o pesquisador responsável.

São Paulo, 14 de junho de 2010.

Profa. Dra. Adelaide José Vaz

Assinatura manuscrita em azul da Profa. Dra. Adelaide José Vaz.

8. Referências

8. Referências

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, et al.. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Antigenic Peptides for Neurocysticercosis Immunodiagnosis Using Serum Samples. J Clin Microbiol 2000; 38:146-151.

Bueno EC, Snege M, Vaz AJ, et al.. Serodiagnosis of Human Cysticercosis by Using Antigens from Vesicular Fluid of *Taenia crassiceps* Cysticerci. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:1140-1144.

Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, et al.. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brasil, 1997. Acta Neurol Scand 2001; 104:208-213.

Carvalho L, Sun J, Kane C, et al.. Review series on helminthes, immune modulation and the hygiene hypothesis: Mechanisms underlying helminth modulation dendritic cell function. Immunology 2008; 126:28-34.

Correale J, Molinas MMB. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. J Neurol 2002; 249:375-389.

Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. Ann Neurol 2007; 61:97-108.

Correale J, Farez M, Razzitte G. Helminth Infections Associated with Multiple Sclerosis Induce Regulatory B Cells. Ann Neurol 2008; 64:187-199.

Espíndula NM, Vaz AJ, Pardini AX, et al.. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 2002; 96:361-368.

Espíndula NM, Iha AI, Fernandes I, *et al.*. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14- kilodalton proteínas from *T. crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. J Clin Microbiol 2005; 43: 3178-3184.

Fragoso YD, Peres M. Prevalence of multiple sclerosis in city of Santos, SP. Rev Bras Epidemiol 2007;10(4):479-82.

Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, *et al.*. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis – a consensus statement. Arch Neurol 2005; 62:865-870.

Gama PD, Machado LM, Livramento JÁ, *et al.*. Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. Arq Neuropsiquiatr 2009; 67:1017-1022.

Ishida MIMI, Rubinsky-Elefant G, Ferreira AW, *et al.*. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. Acta Tropica 2003; 89: 73-84.

La Flamme AC, Canagasabay K, Harvie M, *et al.*. Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 99(Suppl I):33-36.

Lana-Peixoto MA, Callegaro D, Moreira MA, *et al.*. Consenso expandido do Bctrim para o tratamento da esclerose múltipla. Arq Neuropsiquiatr 2002;60(3-B):881-886.

Lana-Peixoto MA, Frota ERC, Campos GB, *et al.*. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brasil. Arq Neuropsiquiatr 2012;70(2):102-107.

Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006; 180:17-28.

Okada H, Kuhn C, Feillet H, *et al.*. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical and Experimental Immunology* 2010; 160:1-9.

Poser CM, McDonald WI. An atlas of multiple sclerosis. Nova York. The Parthenon Publishing Group. 1998.

Reiber H. Cerebrospinal fluid – physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998; 4:99-107.

Ribeiro SBF, Maia DF, Ribeiro JB, *et al.*. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2011;69(2-A):184-187.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989; 299(6710):1259-60.

Sotgiu S, Angius A, Embry A, *et al.*. Hygiene hypothesis: innate immunity, malaria and multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2007; doi10.1016/j.mehy.2006.10.069.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1979; 76:4350-4352.

Vaz, AJ; Nunes, CM; Piazza, RMF; *et al.*. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of

Taenia solium and *Taenia crassiceps*. American Journal of Tropical Medicine Hygiene. 1997b; 57(3) 354-357.

Yu X, Burgoon M, Gren M, *et al.*. Intrathecally synthesized IgG in multiple sclerosis cerebrospinal fluid recognizes identical epitopes over time. J Neuroimmunol 2011; 240-241:129-136.