UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas
Área de Análises Clínicas

Obtenção de proteína recombinante baseada em antígenos do líquido vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no imunodiagnóstico da neurocisticercose

Andréia Bartachini Gomes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dra Adelaide José Vaz
Co-orientadora:
Prof^a Dra Irene da Silva Soares

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas
Área de Análises Clínicas

Obtenção de proteína recombinante baseada em antígenos do líquido vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no imunodiagnóstico da neurocisticercose

Andréia Bartachini Gomes

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dra Adelaide José Vaz
Co-orientadora:
Prof^a Dra Irene da Silva Soares

São Paulo
2010
Andréia Bartachini Gomes

Obtenção de proteína recombinante baseada em antígenos do líquido
vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no imunodiagnóstico da
neurocisticercose

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Dra Adelaide José Vaz
orientador/presidente

1^o examinador

2^o examinador

3^o examinador

4^o examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um novo caminho;
Da queda um passo de dança;
Do medo uma escada;
Do sonho uma ponte;
E da procura...
Um encontro”.

Fernando Sabino

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos que dele participaram, desde quando era um sonho.

A Deus, por permitir que tudo acontecesse e abençoar os meus caminhos.

Ao meu amado marido Fernando, pela compreensão, carinho, bom humor, paciência e companheirismo ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Janice e José, exemplos de retidão e amor incondicional, por me ensinarem a perseguir meus sonhos.

As minhas irmãs Daniela e Juliana, pelo incentivo, amizade e amor.

A minha avó Maria, pelo apoio e exemplo de vida e força a ser seguido por todos nós.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dra. Adelaide José Vaz, pela oportunidade que me foi dada, pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e caráter. Minha eterna gratidão por me ensinar a ser uma profissional e um ser humano melhor.

A Prof^a. Dra. Irene da Silva Soares pelo grande auxílio na obtenção da proteína recombinante e interpretação dos resultados.

A Prof^a. Dra. Kioko Takei, pela convivência harmoniosa, pelo estímulo constante e animador.

Ao Prof^o. Dr. Sandro Rogério de Almeida por abrir as portas de seu laboratório e auxiliar o desenvolvimento dos ensaios de linfoproliferação

A Banca do Exame de Qualificação, Prof^o. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento e Prof^a. Dra. Ednéia Casagrande Bueno, pelas correções e sugestões pertinentes, colaborando para o engrandecimento desse trabalho.

Ao Prof^o. Dr. Luís dos Ramos Machado e Prof^o. Dr. José Antônio Livramento pelas amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocisticercose gentilmente cedidas.

Ao Prof^o. Dr. Luis dos Ramos Machado, por permitir o acompanhamento de pacientes com neurocisticercose, mudando minha visão sobre a doença, o que se tornou grande estímulo e motivação para a realização desse trabalho.

A Prof^a. Dra. Fátima Tiecher pelas amostras de hidatidose gentilmente cedidas.

A Prof^a. Dra. Márcia Imenes pelas amostras de acaridíase, giardíase, strongiloidíase, esquistossomose e amebíase gentilmente cedidas.

Ao Prof^o. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia pelas amostras de teníase gentilmente cedidas.

As minhas amigas Karen, Noeli, Cristiane, Fabyana, Elaine, Kátia, Amanda e Victória, que compartilharam tantos momentos, e juntas contribuíram para a realização desse trabalho.

As minhas amigas Maria Carolina, Simone, Maria Helena, Cláudia e Myrian, pela amizade ímpar e sincera, pelo apoio e solidariedade em todos os momentos dessa caminhada.

A FAPESP, pelo suporte financeiro.

RESUMO

GOMES, A.B. **Obtenção de proteína recombinante baseada em antígenos do líquido vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no imunodiagnóstico da neurocisticercose.** 2010. 129f. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A neurocisticercose (NC) é uma doença provocada por larvas de *Taenia solium* (Tso) no sistema nervoso central. Seu diagnóstico fundamenta-se em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. A utilização de antígenos parasitários no imunodiagnóstico apresenta desvantagens como: necessidade de animais, ausência de homogeneidade entre lotes, baixo rendimento, e contaminação com proteínas suínas. Assim, os antígenos recombinantes podem otimizar o imunodiagnóstico da NC, pois são reagentes simples e reprodutíveis, sem requerer animais. Este estudo teve como objetivo a obtenção, caracterização e análise da reatividade de proteína recombinante baseada em antígenos de líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (Tcra). Assim, o cDNA foi obtido por amplificação a partir de RNAm de cisticercos de Tcra. A proteína recombinante Tc14 foi produzida em *Escherichia coli* (DE3) BL21 utilizando-se o vetor de expressão pET-22b e purificada por cromatografia de afinidade. A caracterização antigênica deu-se por Imunoblot (IB) utilizando anticorpos monoclonais (AcMo). Houve reatividade com todos os AcMo utilizados (AcMo anti-antígeno de excreção/secreção de Tcra, AcMo anti-líquido vesicular de Tcra, AcMo anti-líquido vesicular de Tso e AcMo anti-antígeno total de Tso), exceto com o AcMo anti-antígeno de escólex de Tso. Utilizando-se 22 amostras de soro e 19 de líquido (LCR) de pacientes com NC, 48 soros e 28 LCR do grupo controle negativo (GCN) e 17 soros de hidatidose do grupo outras parasitoses (OP) em Imunoblot foi observada reatividade na região de 14kDa, correspondente a Tc14, em todas as amostras NC, mas não nos GCN e OP. Em ELISA com Tc14 obteve-se sensibilidade (S) e especificidade (E) de 100% com LCR (29 amostras de NC e 35 do GCN) e S de 95,1% e E de 100% com soro (41 amostras de NC, 52 do GCN). Dentre 51 soros de OP, mostraram-se reagentes um de hidatidose e outro de estrogiloidíase. A análise comparativa entre diferentes antígenos e testes sorológicos apresentou índice de positividade de 100% em IB utilizando os antígenos Tc14 ou LLG (antígeno purificado de Tso com lentil-lectina); já em ELISA, os índices foram de 83,4% para Tc14 e 91,6% para 18/14 (antígeno purificado de líquido vesicular de Tcra com AcMo). Em ensaios de linfoproliferação a porcentagem de respondedores no grupo NC foi de 16,6% (com 0,05 e 0,6 µg de Tc14/poço), 50% (com 0,4 µg de Tc14/poço), 44,4% (com 1,0 µg de Tc14/poço) e 20% (com 2,0 µg de Tc14/poço). Não houve proliferação no GCN. A dosagem de citocinas em sobrenadante de cultura apresentou reatividade diferenciada entre o GCN e NC para IL-10, sendo uma amostra do GCN reagente e duas amostras de NC não reagentes. Não foi possível detectar IFN-γ. Em ELISA para IgG total 91,7% dos plasmas do grupo NC apresentaram reatividade, sendo a positividade para os isótipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente, de 75; 33,3; 50 e 25%. O antígeno recombinante mostrou-se como ferramenta promissora para imunoensaios na NC, abrindo nova perspectiva envolvendo estudos a serem realizados sobre diferentes sistemas de expressão e antigenicidade frente a um número maior de amostras.

Palavras-chave: neurocisticercose; antígeno recombinante; ELISA; Imunoblot; linfoproliferação

ABSTRACT

GOMES, A.B. **Recombinant protein obtainment based on antigens from *Taenia crassiceps* vesicular fluid: application on immunodiagnosics of neurocysticercosis.** 2010. 129f. Thesis (doctorate) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The neurocysticercosis (NC) disease is caused by the presence of *Taenia solium* (Tso) larvae in the central nervous system. Its diagnosis is based on clinical criteria, epidemiological studies and laboratorial exams. Nevertheless, the use of parasite antigenic extracts into the immunodiagnosis presents some disadvantages: it requires animals, lacks of homogeneity between lots, low yield and may become contaminated with swine proteins. Consequently, the utilization of recombinant antigens could optimize the immunodiagnostic of NC, as they are simple and reproducible reagents that do not require animals. This study aimed the capture, characterization and reactivity analysis of the recombinant protein based on antigens of the vesicular fluid of *Taenia crassiceps* (Tcra). In order to do so, the cDNA was obtained through the amplification deriving from RNAm of cysticerci of Tcra. The recombinant protein Tc14 was produced in *Escherichia coli* (DE3) BL21 using the expression vector pET-22b and purified by affinity chromatography (nickel resin). The antigenic characterization was performed by immunoblotting (IB) using monoclonal antibodies (MoAb). The recombinant protein presented reactivity with all the MoAb used (Anti-secretion/excretion antigens from Tcra MoAb, anti-vesicular fluid from Tcra MoAb, anti-vesicular fluid from Tso MoAb and anti-total antigen from Tso MoAb), except with the anti-antigen from Tso scolex MoAb. The immunoblot was performed using 22 serum samples and 19 cerebrospinal fluid (CSF) from patients with NC, 48 serum and 28 CSF from the negative control group (GCN) and 17 hydatidosis serum from other parasitosis' group (OP). It showed reactivity in the 14kDa region, correlated to Tc14, in all NC samples, but not presented on GCN and OP. In ELISA with Tc14, the sensibility (S) and specificity (E) of 100% was obtained with CSF (29 NC samples and 35 GCN samples) and 95.1% of S and 100% of E with serum (41 NC samples, 52 GCN samples). Among 51 OP serums, one from hydatidosis and one from strongyloidiasis demonstrated reactivity. The comparative analysis amongst different antigens and serological tests demonstrated positivity of 100% in IB when using the Tc14 antigens or LLG (purified antigen of Tso with lentil lectin). In ELISA, the positivity indicated was of 83.4% for Tc14 and 91.6% for 18/14 (vesicular fluid purified antigen with MoAb from Tcra). In lymphoproliferation tests, the percentage of responders in NC group was of 16.6% (with .0.5 and 6 µg of Tc14/well), 50% (with 0.4 µg of Tc14/well). No proliferation occurred in GCN. The dosage of cytokines in culture supernatants presented different reactivity amongst GCN and NC for IL-10, as one sample of GCN reacted and two NC samples did not. It was not possible to detect IFN-γ. In ELISA for total IgG, 91.7 % of plasmas from NC group presented reactivity, with positivity for the isotypes IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4, 75 %, 33.3 %, 50 % and 25 %, respectively. The recombinant antigen prevails as a promising tool for immunoassays in NC, opening a new perspective involving studies to be performed concerning different expression and antigenicity ahead of a larger number of samples.

Keywords: neurocysticercosis; recombinant antigen; ELISA; Immunoblotting; lymphoproliferation

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Análise eletroforética do produto de PCR correspondente ao gene Tc14.....	53
Figura 2	Análise eletroforética dos plasmídeos recombinantes (vetor de clonagem) não digeridos extraídos por lise alcalina em pequena escala.....	54
Figura 3	Seleção de clones recombinantes (vetor de clonagem) por restrição enzimática e análise em gel de agarose (1,5%).....	54
Figura 4	Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos clones pTcA5 e Tc14.....	55
Figura 5	Análise eletroforética dos plasmídeos recombinantes (vetor de expressão) não digeridos extraídos por lise alcalina em pequena.....	56
Figura 6	Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% da seleção de clones recombinantes (vetor de expressão) por restrição enzimática.....	56
Figura 7	Análise da expressão proteica a partir de diferentes linhagens de bactérias...	57
Figura 8	Deteção da proteína recombinante por Imunoblot utilizando anticorpo anti-histidina.....	58
Figura 9	Otimização da expressão da proteína recombinante a partir de <i>E. coli</i> BL21 após indução com diferentes concentrações de IPTG	59
Figura 10	Análise em SDS-PAGE da proteína recombinante Tc14 purificada por cromatografia de afinidade.....	60
Figura 11	Análise das etapas de purificação da proteína recombinante Tc14 por Imunoblot após eluição com aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol nas concentrações de 250 e 400 mM	60
Figura 12	Imunoblot anti-histidina das frações obtidas após purificação em resina de cobalto.....	61
Figura 13	Imunoblot do antígeno recombinante Tc14 frente a diferentes anticorpos monoclonais.....	62
Figura 14	Imunoblot demonstrando o perfil de reatividade de amostras de soro e LCR de pacientes com NC e grupo controle negativo, além de análise de reatividade cruzada com soros de outras parasitoses frente ao antígeno Tc14	64
Figura 15	Representação gráfica das absorbâncias obtidas na padronização de ELISA para pesquisa de IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i> utilizando amostras de LCR.....	66
Figura 16	Representação gráfica das absorbâncias obtidas na padronização de ELISA para pesquisa de IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i> utilizando amostras de soro.....	68

Figura 17	Representação gráfica dos índices de reatividade obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i>	70
Figura 18	Representação gráfica dos índices de estimulação obtidos após estímulo antigênico com diferentes concentrações de Tc14	75
Figura 19	Representação gráfica da porcentagem de indivíduos respondedores baseada na proliferação de células mononucleares de indivíduos com NC frente a estímulo antigênico com Tc14 em diferentes concentrações.....	75
Figura 20	Representação gráfica da quantificação da citocina IL-10 obtida por ELISA de captura em sobrenadante de cultura após estímulo com Tc14.....	76
Figura 21	Representação gráfica dos índices de reatividade obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i> utilizando antígeno recombinante Tc14	77
Figura 22	Porcentagem de positividade obtida em ELISA para pesquisa de isótipos de IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i> em 11 plasmas de indivíduos acometidos pela NC.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Positividade do teste ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i> em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose, grupo controle negativo e outras parasitoses utilizando diferentes <i>cut offs</i>	71
Tabela 2	Porcentagem de positividade obtida com 12 amostras de soro de pacientes com neurocisticercose comparando-se diferentes imunoensaios para detecção de anticorpos IgG anti-cisticerco de <i>T. solium</i>	72
Tabela 3	Dados clínicos de 10 pacientes com NC e concentrações antigênicas de Tc14 (µg/poço) nas quais foi possível observar linfoproliferação.....	74
Tabela 4	Perfil de reatividade de 12 plasmas de indivíduos acometidos pela neurocisticercose em ELISA utilizando-se Tc14 para determinação de isótipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4).....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo: anticorpo monoclonal

Ag: antígeno

A-G: bases nitrogenadas purínicas - Adenina e Guanina

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AL: Ausência de linfoproliferação

ANOVA: Análise estatística de Variância

BL-21, Rosetta-gami, pLys S, Ril e BL21-Rp: bactérias recombinantes de *E. coli* DE3

C-: pacientes não portadores de NC, controle negativo

C+: pacientes portadores de NC, controle positivo

cDNA: DNA complementar

cpm: contagem por minuto

Da: Daltons (unidade de massa atômica, segundo Sistema Internacional de Unidades)

DNA: ácido desoxirribonucléico

E. coli: bactéria da espécie *Escherichia coli*

E: AcMo anti- antígeno de escólex de *T. solium*

EcoRI e HindIII: enzimas de restrição utilizadas

EDTA: composto orgânico ácido etilenodiamino tetra-acético

EITB: nomenclatura referente ao Immunoblot baseado em glicoproteínas de *T. solium*, assim denominado pelos autores que o produziram

ELISA 18/14: ensaio ELISA utilizando o antígeno 18/14 de *T. crassiceps*

ELISA Tc14: ensaio ELISA utilizando antígeno recombinante Tc14 de *T. crassiceps*

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ES: antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*

GCN ou GC: grupo controle negativo

GP: glicoproteína

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IBES: Immunoblot com antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*

IBLLGP: Immunoblot com antígeno purificado de *T. solium*

IBLVTcra: Immunoblot com antígeno líquido vesicular de *T. crassiceps*

IBTc14: Immunoblot com antígeno recombinante de *T. crassiceps*

IBTso: Immunoblot com antígeno total de *T. solium*

IE: índice de estimulação

IFN: interferon

IgG: imunoglobulina de classe IgG

IL: interleucina

IPTG: isopropylthio-β-D-galactoside

L: amostras de LCR

LB: meio de cultura Luria Bertani para bactéria suplementado com 2% LB broth base e 0,5% NaCl, pH 7,0

LCR: líquido cefalorraquidiano

LLGP: glicoproteínas de *T. solium* purificadas em coluna com lentil lectina

LT Tso: líquido vesicular de *T. solium*

LV Tcra: líquido vesicular de *T. crassiceps*

LVTcra: antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps*

RNAm: RNA mensageiro

Na₂CO₃: carbonato de sódio

NaCl: cloreto de sódio

NaHCO₃: bicarbonato de sódio

NC: neurocisticercose

OP: outras parasitoses

OPD: substrato cromogênico *orto*-fenilenediamina

PBS: tampão fosfato salina (Na₂HPO₄ 0,0075M, NaH₂HPO₄ 0,025M e NaCl 0,14M, pH 7,2)

PBS-T: tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20

pET-22b: plasmídeo que permite a obtenção de proteína recombinante fusionada com histidina

pH: potencial hidrogeniônico que indica se uma solução líquida é ácida, alcalina ou neutra

pHIS: vetor pET-22b paralelo I modificado por SHEFFIELD *et al.* (1999)

pMOS: plasmídeo utilizado em processos de clonagem

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

pTCA5: proteína recombinante baseada em líquido vesicular de *T. crassiceps*

rES38 e rES33: proteínas recombinantes para diagnóstico da teníase

rGP50 e T24H: proteínas recombinantes para diagnóstico da cisticercose

RNA: ácido ribonucleico

RNAse: enzima Ribonuclease

RPMI: meio de cultura RPMI 1640 suplementado com HEPES 10mM, gentamicina 100 U.mL⁻¹, L-Glutamina 2mM, aminoácidos não essenciais 1%, piruvato de sódio 1mM, mercaptoetanol 0,05mM e soro humano AB 10%

RT-PCR: Real Time - Polymerase Chain Reaction

S: amostras de soro

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE: Gel de eletroforese com poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

SOB: meio de cultura para bactéria suplementado com 2% triptone, 0,5% extrato de levedura e 0,5% NaCl, pH 7,0

SOC: meio de cultura SOB para bactéria suplementado com 10 mM MgCl₂ e 20 mM Glicose

sTsRS1, sTs18var 1 e sTs14: peptídeos sintéticos

***T. crassiceps*:** espécie *Taenia crassiceps*

***Tcra*:** *Taenia crassiceps*

***T. saginata*:** espécie *Taenia saginata*

***T. solium*:** espécie *Taenia solium*

Tso: *Taenia solium*

T: AcMo anti- antígeno total de *T. solium*

Tc14: antígeno de *Taenia crassiceps*

TCD4⁺ e TCD8⁺: linfócito T contendo o *cluster de diferenciação* ou glicoproteína expressa em sua superfície, 4⁺ ou 8⁺

TcMet-1, TcMet-2 e Ketc7: antígenos recombinantes baseados em *T. crassiceps*

Teste de Tukey: Análise estatística de comparação de Média

Th: linfócito T helper

TRIS/HCl: solução TRIS acidificada com ácido clorídrico

TRIS: composto orgânico tris (hidroximetil) aminometano - (HOCH₂)₃CNH₂

Ts8B2-GST: antígeno recombinante baseado em *T. solium* fusionado a glutathione

TsM, Ag1V1/Ag2, G-F18, GP 50: antígenos recombinantes baseados em *T. solium*

TSOL18 e TSOL45-1A: proteínas recombinantes de *T. solium*

U-C-T: bases nitrogenadas pirimídicas - Uracila, Citosina e Timina

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1. Aspectos Gerais.....	22
2.2. Aspectos Epidemiológicos	23
2.3. Aspectos Biológicos.....	25
2.4. Aspectos Clínicos.....	26
2.5. A Resposta Imunológica: isótipos de IgG e dosagem de citocinas.....	28
2.6. Diagnóstico da Neurocisticercose.....	30
2.6.1. Pesquisa de Anticorpos.....	30
2.6.2. Antígenos Alternativos.....	31
2.6.2.a. Antígeno heterólogo de <i>T. crassiceps</i> para pesquisa de anticorpos.....	32
2.6.2.b. Antígenos recombinantes.....	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Geral.....	36
3.2. Específicos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Amostras de Sangue e LCR.....	37
4.2. Obtenção de Antígeno Recombinante em Procarioto.....	38
4.2.1. Processos de Clonagem.....	38
4.2.1.1. Extração de RNAm.....	38
4.2.1.2. Obtenção do cDNA.....	39
4.2.1.3. Amplificação do DNA por PCR.....	39
4.2.1.4. Purificação do produto de PCR.....	39
4.2.1.5. Transformação de bactérias DH5α competentes com DNA plasmidial.....	40
4.2.1.6. Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina.....	40
4.2.1.7. Digestão Enzimática.....	41
4.2.1.8. Sequenciamento do DNA.....	41
4.2.1.9. Subclonagem do inserto em vetor para expressão em bactérias.....	42
4.2.1.10. Transformação de bactérias competentes com DNA plasmidial.....	42
4.2.2. Obtenção da Proteína Recombinante.....	42
4.2.2.1. Escolha do melhor sistema de expressão.....	42
4.2.2.2. Imunoblot com Anticorpo Monoclonal (AcMo) Anti-Histidina.....	43
4.2.2.3. Expressão da Proteína Recombinante.....	44
4.2.2.4. Purificação da Proteína Recombinante em resina de cobalto ou níquel.....	45
4.2.2.5. Dosagem do antígeno recombinante.....	45
4.2.3. Avaliação da Proteína Recombinante em Imunoensaios.....	45
4.2.3.1. Caracterização do antígeno recombinante frente a anticorpos monoclonais.....	45
4.2.3.2. Perfil de reatividade da proteína recombinante por Imunoblot utilizando amostras de soro e LCR	46
4.2.3.3. ELISA.....	47
4.2.3.3.a. Padronização de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticercose de <i>T. solium</i> em soro e LCR.....	47
4.2.3.3.b. ELISA	48
4.2.3.4. Comparação de Testes Sorológicos utilizando diferentes antígenos frente a amostras de soro de pacientes com NC.....	49

4.2.4. Imunoestimulação promovida pelo antígeno recombinante <i>in vitro</i> , dosagem de citocinas e isotipagem.....	50
4.2.4.1. Linfoproliferação	50
4.2.4.2. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura.....	51
4.2.4.3. ELISA para isotipagem de IgG em plasma.....	52
4.3. Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Obtenção de proteína recombinante em sistema procarioto.....	53
5.1.1. Processos de Clonagem	53
5.1.1.1. Extração de RNAm.....	53
5.1.1.2. Amplificação do DNA por PCR.....	53
5.1.1.3. Transformação de bactérias DH5 α competentes e extração de plasmídeos por lise alcalina.....	54
5.1.1.4. Sequenciamento do DNA.....	55
5.1.1.5. Subclonagem do inserto em vetor de expressão.....	55
5.1.2. Expressão da Proteína Recombinante.....	56
5.1.2.1. Escolha do melhor sistema de expressão	57
5.1.2.2. Otimização da quantidade de IPTG para melhor indução.....	58
5.1.2.3. Purificação da Proteína Recombinante.....	59
5.1.2.3.a. Purificação em resina de níquel.....	59
5.1.2.3.b. Purificação em resina de cobalto.....	61
5.1.2.4. Dosagem do Antígeno Recombinante Tc14.....	61
5.1.3. Avaliação da Proteína Recombinante em Imunoensaios.....	62
5.1.3.1. Caracterização do antígeno recombinante frente a diferentes anticorpos monoclonais.....	62
5.1.3.2. Perfil de reatividade da proteína recombinante por Immunoblot utilizando amostras de soro e LCR.....	63
5.1.3.3. Padronização de ELISA	65
5.1.3.3.a. Utilizando amostras de LCR.....	65
5.1.3.3.b. Utilizando amostras de soro.....	67
5.1.3.3.c. Reatividade em ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-antígenos de cisticerco de <i>Taenia solium</i> nos grupos controle positivo, controle negativo e outras parasitoses.....	69
5.1.3.4. Comparação de Testes Sorológicos utilizando diferentes antígenos em amostras de pacientes com NC.....	71
5.1.4. Imunoestimulação promovida pelo antígeno recombinante <i>in vitro</i> e dosagem de citocinas.....	72
5.1.4.1. Linfoproliferação.....	72
5.1.4.2. Dosagem de Citocinas.....	76
5.1.4.3. Verificação da reatividade de IgG total e Isótipos em plasma frente ao antígeno recombinante Tc14 por ELISA.....	77
6. DISCUSSÃO.....	80
6.1. Antígeno Recombinante.....	80
6.2. Antigenicidade do antígeno recombinante.....	82
6.2.1. Frente aos anticorpos monoclonais.....	82
6.2.2. Immunoblot.....	83
6.2.3. ELISA.....	84
6.2.4. Correlação entre os testes.....	88
6.3. Imunoestimulação do antígeno recombinante <i>in vitro</i> e dosagem de citocinas.....	88
6.4. Determinação de Isótipos.....	92
7. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
	114

ANEXOS.....

1. INTRODUÇÃO

Dentre as doenças parasitárias capazes de acometer o sistema nervoso, a NC é a mais comum (DEL BRUTTO *et al.*, 1992; MEDINA & DEGIORGIO, 2002), sendo considerada uma importante causa de epilepsia no mundo (SINHA & SHARMA, 2009). O diagnóstico da NC baseia-se em exames de neuroimagem (tomografia e ressonância magnética) e/ou ensaios imunológicos (ELISA e Imunoblot) utilizando-se soro e/ou líquido cefalorraquidiano para a análise (TAKAYANAGUI *et al.*, 2006). Devido ao alto custo dos exames de imagem, muitos trabalhos relacionados aos imunoensaios vêm sendo desenvolvidos a fim de possibilitar o alcance do diagnóstico da NC às populações menos favorecidas. Estudos com diferentes antígenos almejam a obtenção de ensaios com altos índices de sensibilidade e especificidade. Muitos autores demonstraram índices de sensibilidade variando de 70,6 a 100% e especificidade variando de 80 a 100% ao empregarem antígenos de cisticercos de *T. solium* em teste ELISA (BUENO *et al.*, 2000; FELDMAN *et al.*, 1990; ITO *et al.*, 1998; PERALTA *et al.*, 2002; PLANCARTE, FEXAS & FLISSER, 1994; RESTREPO *et al.*, 2000). É considerado ensaio sorológico de referência o Imunoblot que utiliza glicoproteínas de cisticerco de *T. solium* purificadas em coluna de lentil-lectina obtido por TSANG, BRAND & BOYER (1989), com sensibilidade de 98% e especificidade de 100%. Entretanto, este método apresenta como limitações: baixo rendimento de antígeno obtido, necessidade da manutenção dos cisticercos em suínos e possibilidade de ser falso negativo em pacientes com um só cisticerco (WILSON *et al.*, 1991). Diversos trabalhos comprovam que o antígeno heterólogo de cisticerco de *T. crassiceps* demonstra forte reatividade cruzada com os antígenos de cisticerco de *T. solium*, sendo, portanto uma fonte antigênica alternativa e mais facilmente obtida para o diagnóstico da NC (BUENO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2007; LARRALDE *et al.*, 1989, 1990; PERALTA *et al.*, 2002; VAZ *et al.*, 1996). ESPINDOLA *et al.* (2005) obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade ao utilizar ELISA com frações proteicas de 18- e 14 kDa purificadas de líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*, estabelecendo assim a importância das proteínas de 18- e 14 kDa no diagnóstico da NC.

Atualmente, ressalta-se que o uso de antígenos recombinantes permite a obtenção de grande quantidade de antígeno sem a utilização de animais para a manutenção de cisticercos viáveis (GREENE *et al.*, 2000; OBREGON-HENAO *et al.*, 2001, SILVA *et al.*, 2006), além de apresentar menor variação lote a lote quando comparados aos antígenos brutos e purificados (ROBLES *et al.*, 2005).

Dentre os trabalhos estudados sobre proteínas recombinantes, foi selecionado o de ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994) como base para o desenho dos *primers* utilizados para obtenção da sequência de cDNA correspondente à proteína recombinante aqui obtida, denominada Tc14. Essa escolha se deu devido à alta similaridade entre a proteína obtida pelos referidos autores e as proteínas de 18- e 14 kDa de *T. crassiceps*. Resumidamente, ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994) construíram uma biblioteca de cDNA a partir de cisticercos de *T. crassiceps* utilizando o vetor λ gt11. A biblioteca foi selecionada a partir de soro hiperimune de coelho contra antígeno de *T. hydatigena* e de soros provenientes de bovinos com cisticercose induzida experimentalmente. Dentre os clones obtidos, foi selecionado o que continha inserto de 279 bp para subclonagem no plasmídeo pPR987, gerando uma proteína de 47kDa denominada TcA2-MBP. A proteína TcA2-MBP mostrou-se reativa em ELISA frente ao soro de bovinos experimentalmente infectados com ovos de *T. saginata*. Após a imunização de coelhos com a proteína recombinante, os autores demonstraram que o soro policlonal obtido foi capaz de reconhecer proteínas de 10 kDa do líquido vesicular de *T. crassiceps*, bem como as proteínas de excreção e secreção deste parasita.

Diferentemente dos métodos utilizados para obtenção da proteína TcA2-MBP, utilizamos o plasmídeo PET-22b, que proporciona a proteína recombinante fusionada a histidina, devido aos meios de purificação disponíveis para a realização de nosso estudo, além de não utilizarmos pré-adsorção dos soros e LCR com lisado de *E. coli* (sistema de expressão) antes da realização dos testes sorológicos.

Dentre os trabalhos disponíveis para a obtenção de antígenos recombinantes algumas diferenças podem ser apontadas. Em suma apresentamos:

i) DNA de origem: obtenção do cDNA a partir de cisticercos de *T. solium* (CHUNG *et al.*, 1999; GAUCI *et al.*, 1998; GREEN *et al.*, 2000; HANCOCK *et al.*, 2004, 2007; HUBERT *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2001; KALINNA & McMANUS, 1996; LEE *et al.*, 2005;

LEVINE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2006; MAYTA *et al.*, 2007; MONTERO *et al.*, 2003; SAKO & ITO, 2001; SAKO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006) ou *T. saginata* (FERRER *et al.*, 2007a).

ii) vetor: proteínas fusionadas a maltose com o vetor pGEX (CHUNG *et al.*, 1999; FERRER *et al.*, 2007; MONTERO *et al.*, 2003); proteínas fusionadas a histidina com os vetores pQE-30 (FERRER *et al.*, 2009), pQE-31 (MONTERO *et al.*, 2003) e pET-28a (SILVA *et al.*, 2006); utilização de baculovírus (FERRER *et al.*, 2009; FERRER *et al.*, 2007a; LEE *et al.*, 1999; LEVINE *et al.*, 2007).

iii) sistema de expressão: *E. coli* M15 (MONTERO *et al.*, 2003), células Sf9 (FERRER *et al.*, 2009; HANCOCK, *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 1999), células High Five (FERRER *et al.*, 2007a; HANCOCK *et al.*, 2007).

Assim como no presente trabalho, outros autores utilizaram o sistema *E. coli* BL-21 (CHUNG *et al.*, 1999; FERRER *et al.*, 2007b; FERRER *et al.*, 2007 b; SILVA *et al.*, 2006, SAKO *et al.*, 2006; SAKO & ITO, 2001) ou partiram de *T. crassiceps* para obtenção das proteínas recombinantes (FISCHER *et al.*, 1994; GEVORKIAN *et al.*, 1996; MANOUTCHARIAN *et al.*, 1996; ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN, 1994).

A diferenciação entre os parâmetros sorológicos obtidos por estes e outros autores em relação ao observado com o antígeno recombinante aqui obtido (Tc14) nos imunoenaios será abordada posteriormente durante a revisão bibliográfica e discussão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS

As manifestações clínicas decorrentes do complexo teníase-cisticercose constituem um importante problema de saúde pública em regiões que apresentam carência de educação sanitária e de políticas de saúde, bem como falta de inspeção de carnes suínas e de saneamento básico. Pode-se somar a estes fatores o favorecimento do aparecimento da doença através de hábitos alimentares que incluem a ingestão de carne de suínos crua ou mal cozida. Dentre os impactos de maior recorrência, relacionados à mortalidade e morbidade em humanos e suínos são citados os danos teciduais, cerebrais e intestinais, de forma associada ou isolada (RAMOS JR *et al.*, 2004).

O homem é o hospedeiro definitivo da *T. solium*, que alberga a forma adulta do parasita, denominada tênia, em seu intestino delgado, sendo a doença intitulada teníase. Para que isso ocorra é necessária a ingestão da forma larvária viável do parasita, chamada de cisticerco, presente em carne de suínos contaminada crua ou mal cozida (VAZ & LIVRAMENTO, 1996). Quando o homem com teníase elimina os ovos embrionados de *T. solium* no meio ambiente, propicia o contato e a ingestão desses ovos viáveis pelos suínos ou, acidentalmente, pelo próprio homem, acarretando na cisticercose, caracterizada pela presença de cisticercos em tecidos ou órgãos. A neurocisticercose (NC) é a forma mais grave desta patologia em humanos, sendo caracterizada pela presença de cisticercos no sistema nervoso (REY, 2001).

Sendo assim, o contato de suínos com fezes contaminadas contendo ovos ou proglotes inteiras de *T. solium*, bem como o consumo por seres humanos de carne suína contaminada mal cozida, além da comercialização de carne suína não inspecionada são fatores que promovem e mantêm a transmissão da doença (FLISSER *et al.*, 1993; GARCIA *et al.*, 1991; SARTI-GUTIERREZ *et al.*, 1988).

As graves manifestações clínicas, principalmente decorrentes da NC, justificam a implementação de medidas profiláticas, porém, sua implantação ainda é considerada difícil em países em desenvolvimento. Sugerem-se o efetivo saneamento básico,

melhoria dos hábitos de higiene, controle da água consumida e rigorosa inspeção da carne suína, além do diagnóstico precoce da teníase devido ao risco da continuidade do ciclo (GARCIA *et al.*, 2002).

2.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A cisticercose causada por *T. solium* é uma importante infecção parasitária que acomete seres humanos e suínos em muitos países em desenvolvimento na América Latina, África e Ásia (RAJSHEKHAR *et al.*, 2003; PHIRI *et al.*, 2003; WHO, 2002; ZOLI *et al.*, 2003). A doença é uma das zoonoses mais graves causadas por cestóides, mesmo em comunidades muçulmanas e judaicas, nas quais o consumo de carne suína é proibido por fatores religiosos (CRAIG, ROGAN & ALLAN, 1996; SCHANTZ *et al.*, 1992, 1993; SIMANJUNTAK *et al.*, 1977). Outros países em desenvolvimento já apresentaram preocupação com o complexo teníase/cisticercose, como Indonésia (WANDRA *et al.*, 2006), Venezuela (MEZA *et al.*, 2005), Peru (HUISA *et al.*, 2005) e Bolívia (NICOLETTI *et al.*, 2005).

Estudos sugerem que a cisticercose pode ser considerada uma patologia que representa um “marcador biológico” do desenvolvimento econômico da comunidade, já que está associada a condições deficientes de saneamento básico (CARPIO, ESCOBAR & HAUSER, 1998; SARTI *et al.*, 1994), sendo a doença parasitária mais comumente associada à infestação do sistema nervoso central e a mais prevalente causa de epilepsia nos países em desenvolvimento (GARCIA, GONZALES & GILMAN, 2003; PRASAD *et al.*, 2008). Porém, não se restringe somente aos mesmos, já que mais de 1000 casos por ano foram relatados nos Estados Unidos da América (SCHANTZ *et al.*, 1992). Trabalhos anteriores (SCHANTZ *et al.*, 1993; SCHANTZ, WILKINS & TSANG, 1999) já relatavam que países que recebem grande número de imigrantes, como é o caso dos Estados Unidos, devem incluir em seus programas de saúde as parasitoses trazidas por viajantes a negócios ou turismo provindos de regiões endêmicas.

Alguns autores apresentaram relevantes estudos epidemiológicos sobre a NC em diversos países, como o Brasil (AGAPEJEV, 2003; BRAGAZZA *et al.*, 2002),

Indonésia (WANDRA *et al.*, 2006), Venezuela (MEZA *et al.*, 2005), Peru (HUISA *et al.*, 2005), Bolívia (NICOLETTI *et al.*, 2005) e Índia (PRASAD *et al.*, 2008; RAJSHEKHAR *et al.*, 2006) demonstrando a presença do complexo teníase-cisticercose nestes locais. Há uma estimativa de 75 milhões de indivíduos acometidos por esta patologia em regiões endêmicas da América Latina, sendo que destes, 400.000 apresentam sintomas (BERN *et al.*, 1999).

Tanto a teníase quanto a cisticercose não são doenças de notificação compulsória no Brasil, dificultando o acompanhamento de um estudo epidemiológico apurado no território nacional. Somam-se a este fato a alta complexidade do diagnóstico e tratamento da cisticercose, muitas vezes acarretando no deslocamento dos indivíduos com suspeita da patologia para os grandes centros urbanos a fim de encontrar tratamento e diagnóstico apropriados, o que pode resultar na perda da procedência destes pacientes (SILVA-VERGARA *et al.*, 1995). Esta migração permite que, talvez erroneamente, a região urbana seja considerada como prevalente em relação às formas mais graves da NC (AGAPEJEV, 2003).

O desnivelamento tecnológico demonstrado entre os estados brasileiros e a inexistência de estudos epidemiológicos sistematizados propicia dificuldades na obtenção de referências sobre a real prevalência e incidência da cisticercose humana e suína em estados do norte e centro-oeste (AGAPEJEV, 2003). Mesmo considerando estas dificuldades, AGAPEJEV (2003) analisou o uso relativo de publicações sobre NC de cada estado brasileiro no período de 1915 a 2002 em relação à população do país segundo o *Censo* de 2000, verificando que, embora subestimada, a prevalência da NC pode ser representada em ordem decrescente: no Distrito Federal, estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (AGAPEJEV, 2003). Contudo, a autora ressalta que o material oferecido pela literatura nacional não permite afirmar que a NC prevalece mais em um ou outro Estado ou região do país.

Ribeirão Preto, cidade do estado de São Paulo, foi pioneira na notificação compulsória para cisticercose em 1988. Segundo TAKAYANAGUI & LEITE (2001), a prevalência de NC entre 1992-1999 foi de 74 casos/100.000 habitantes, e dentre os indivíduos infectados, 21% apresentavam a forma ativa da doença. Assim, na região,

justificou-se a necessidade de medidas de prevenção imediatas, perfil epidemiológico este que pode também estar presente em outras regiões do país.

Dessa forma, no Brasil, o desenvolvimento de técnicas imunodiagnósticas para a pesquisa de antígenos de *T. solium* e anticorpos anti-cisticercos pode auxiliar em estudos epidemiológicos, possibilitando uma estimativa real da prevalência de cisticercose suína e humana nas regiões brasileiras.

2.3. ASPECTOS BIOLÓGICOS

O parasito pertence ao filo *Platyhelminthes* (verme chato), classe *Cestoidea* (hermafrodita, desprovido de tubo digestivo, corpo achatado dorsoventralmente em forma de fita, composto de segmentos gerados a partir do colo), ordem *Cyclophyllidea* (um único hospedeiro intermediário e oncosfera protegida por embrióforo não ciliado), família *Taeniidae* (escólex, útero em forma de tubo longitudinal mediano com ramificações laterais e poros genitais alternos), gênero *Taenia* e espécie *T. solium* (REY, 2001).

O envoltório do ovo de *T. solium* se desintegra no sistema digestivo do suíno, liberando o embrião hexacanto que penetra ativamente na mucosa intestinal e chega à circulação, podendo se alojar em diferentes tecidos (FLISSER, 1991). O desenvolvimento pleno dos cisticercos leva cerca de 60 dias após a ingestão dos ovos (CARPIO & HAUSER, 2002; FLISSER, 1991). Nos suínos, os cisticercos usualmente não causam danos apreciáveis, as larvas se fixam no tecido conjuntivo intermuscular onde são envolvidas por uma cápsula adventícia formada pela reação do organismo do hospedeiro (FREITAS, 1980).

O cisticerco de *T. solium* consiste basicamente em uma vesícula semitransparente com cerca de 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, contendo líquido vesicular e um escólex invaginado em seu interior (PESSOA & MARTINS, 1988). O líquido vesicular é composto de água, sais minerais, proteínas, uréia, creatinina, ácido úrico, glicose e traços de colesterol (SPINA-FRANÇA *et al.*, 1977). Segundo estudos em microscopia eletrônica, a espessura da parede vesicular

varia de 70 a 100 μm e a superfície exterior desse tegumento possui microvilosidades que aumentam em dezenas de vezes a sua área total (RAMIREZ-BON *et al.*, 1982).

Apenas a *T. solium* tem sido associada ao complexo teníase/cisticercose no ser humano, embora esporadicamente o parasita possa estar presente em outros hospedeiros intermediários, como em ursos negros (THEIS *et al.*, 1996), cachorros (ITO *et al.*, 2002) e gatos (SCHWAN *et al.*, 2002). Também foi relatado um caso de cisticercose humana causada por *T. crassiceps*, parasita de raposa, em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (CHERMETTE *et al.*, 1995; FRANCOIS *et al.*, 1998; GARG, 2002).

2.4. ASPECTOS CLÍNICOS

A cisticercose humana pode ser desenvolvida no globo ocular, no sistema nervoso central, tecido subcutâneo e músculos. Os locais mais comuns da cisticercose muscular são as coxas e braços, podendo ocorrer também no coração em 5% dos casos (GARCIA *et al.*, 2003).

De forma geral, observa-se pouca ou nenhuma resposta inflamatória local enquanto o parasita está vivo, ocorrendo imunotolerância do hospedeiro aos cisticercos presentes. Considerável resposta imunológica ocorre quando os parasitas iniciam a sua degeneração, formando um granuloma como resultado da resposta inflamatória do hospedeiro no tecido atingido, que resulta em edema. Nesta fase ocorre liberação maciça de antígenos, produção de grande quantidade de anticorpos, formação de imunocomplexos e exacerbação do processo inflamatório. O final do processo culmina em calcificação da região afetada (RAHALKAR *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2006).

A denominação NC decorre da presença de cisticercos no sistema nervoso, sendo os locais de maior acesso as leptomeninges, os ventrículos e o parênquima cerebral, podendo ainda ser encontrado no canal espinhal (LIVRAMENTO *et al.*, 1993), lobos parietais e frontais predominantemente à direita (AGAPEJEV, 2003) e quarto ventrículo (GARCIA *et al.*, 2002).

A NC ocorre predominantemente entre 21-40 anos, com maior frequência em pacientes do sexo masculino, porém, as manifestações mais graves foram observadas

nos pacientes do sexo feminino (AGAPEJEV, 2003), provavelmente devido à presença dos níveis de hormônios esteróides (FLEURY *et al.*, 2004).

A localização do cisticerco na região intraparenquimal normalmente está associada com bom prognóstico, sendo que frequentemente pacientes com poucos cistos intraparenquimatosos permanecem assintomáticos (CHIMELLI, LOVALHO & TAKAYANAGUI, 1998; WHITE, 2000). A sintomatologia pode ocorrer após dias, meses ou anos decorridos da infecção, dependendo da localização, tamanho e número dos cisticercos viáveis ou calcificados presentes (NASH, 2003), além da resposta imunológica do hospedeiro (RAHALKAR *et al.*, 2000) e de variáveis nutricionais e genéticas, tanto do hospedeiro quanto do parasita (AGAPEJEV, 2003). Assim, a diversidade clínica demonstrada pelos pacientes com NC é o resultado de uma resposta imune que é imprevisível e individual, variando de uma completa tolerância a uma intensa resposta (CARPIO, ESCOBAR & HAUSER, 1998).

As apresentações clínicas mais frequentes são: epilepsia, quadros psíquicos e demenciais e hipertensão intracraniana, este último responsável pela elevada letalidade (AGAPEJEV, 2003; MACHADO, PIALARISSI & VAZ, 1988). Ocorrem também com frequência dores de cabeça súbitas, tonturas, vômitos, variações de pulsação e de respiração (REY, 2001). Dentre os sintomas acima citados, considera-se a epilepsia como o de maior ocorrência, sendo estimada sua manifestação em cerca de 70 a 90% dos pacientes de áreas endêmicas (CARPIO & HAUSER, 2002; GARCIA, GONZALES & GILMAN, 2003; GARCIA *et al.*, 2003; PAL, CARPIO & SANDER, 2000; TAKAYANAGUI & JARDIM, 1983).

A forma racemosa do cisticerco, caracterizada por um complexo de vesículas de tamanho desigual dispostas em cacho de uva sem a presença de escólex, foi relatada tanto em pacientes imunocompetentes (PRASAD *et al.*, 2008) quanto descreveram esta forma em indivíduos com a síndrome da imunodeficiência adquirida DELOBEL *et al.* (2004).

O tratamento dos pacientes com NC deve ser individualizado, levando-se em conta o quadro sintomatológico, a resposta imunológica do hospedeiro, além do número, localização e viabilidade dos cisticercos. De forma geral, podem ser empregados antiepilépticos, analgésicos, corticosteróides e processo cirúrgico de forma

combinada ou isolada (TAKAYANAGUI & ODASHIMA, 2006). O alto custo das hospitalizações, que ocorrem normalmente entre 1 a 254 dias (GARCIA & DEL BRUTTO, 2000), do tratamento e das perdas salariais sustentam a necessidade de um diagnóstico precoce com alta sensibilidade e especificidade.

2.5. A RESPOSTA IMUNOLÓGICA: ISÓTIPOS DE IgG E DOSAGEM DE CITOCINAS

Diferentes perfis de expressão de citocinas e presença de diversos isótipos de anticorpos podem ser associados à progressão de doenças, tenham elas caráter autoimune, traumático ou infeccioso. Comumente, a resposta imunológica inflamatória pode estar intimamente associada à sintomatologia e à severidade dos sintomas (KNOPF *et al.*, 1998; OPRICA *et al.*, 2003). Segundo CHAVARRÍA *et al.* (2005) existem poucos estudos sobre a resposta imunológica local induzida por infecções no SNC, devido a dificuldade de obtenção de material biológico de pacientes. A NC enquadra-se neste panorama, por se tratar de patologia com variações clínicas que vão desde a ausência de sintomas até epilepsia e aumento de pressão intracraniana (FLEURY *et al.*, 2003, 2004; FRAGOSO *et al.*, 1998; SCIUTTO *et al.*, 1991; VEJA *et al.*, 2003).

CHAVARRIA *et al.* (2003) relataram a presença de IL-4, IL-5 e IL-13 em sobrenadante de cultura celular, de indivíduos acometidos pela NC, após estímulo com o antígeno de cisticerco de *T. solium* e aumento de IgG4 no plasma de pacientes assintomáticos, sugerindo que a predominância Th2 promove a evolução silenciosa da doença. Por outro lado, GREWAL *et al.* (2000) relataram a presença de IFN- γ e IL-2 em sobrenadante de cultura, sugerindo predomínio do padrão Th1. Adicionalmente, trabalhos demonstraram níveis elevados de IL-12, IL-18 e IFN- γ , bem como infiltração de macrófagos ao redor dos cisticercos, sugerindo resposta Th1 (RESTREPO *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 2000). Por outro lado, CHAVARRIA *et al.* (2005) demonstraram altos níveis de IL5 e IL-6 em LCR de pacientes com múltiplos cistos. Somado a isso, mulheres apresentaram o aumento dessas citocinas e IL-10, sugerindo diferenças na resposta imunológica em relação aos homens. EVANS *et al.* (1998) relataram aumento na concentração de IL-5 e Eotaxina no soro de pacientes com NC, além de IL-8 e IL-6

no LCR. Dessa forma, muitos aspectos envolvendo a resposta imunológica na NC permanecem desconhecidos (CARPIO, 2002; WANG *et al.*, 2008).

Em contraste com muitos relatos sobre a detecção de IgG total, poucos estudos sobre a dosagem das subclasses dessa imunoglobulina na neurocisticercose foram realizados. A IgG possui 4 subclasses, que apresentam diferenças funcionais e estruturais na região constante da cadeia pesada, particularmente nos domínios CH1 e CH3 (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008). Essas subclasses de IgG receberam numeração (IgG1, IgG2, IgG 3 e IgG4) de acordo com a concentração sérica desses anticorpos no soro de indivíduos saudáveis do leste Europeu (SCHROEDER & CAVANCINI, 2010). Em alguns processos infecciosos, a predominância de subclasses de IgG parece estar estabelecida (SHORT *et al.*, 1990), como a predominância de IgG1 e IgG3 contra antígenos virais e antígenos provenientes de bactérias não capsuladas (HAMMARSTROM & SMITH, 1986; SKVARIL, 1986) e de IgG2, seguida por IgG1 e IgG4 frente a antígenos polissacarídeos componentes da cápsula bacteriana (HAMMARSTROM & SMITH, 1986). Por outro lado, em algumas doenças parasitárias, como a NC, a predominância das subclasses não está esclarecida, talvez devido às diferentes fases da doença e das variações individuais do hospedeiro respondedor (SCHANTZ *et al.*, 1996). SHORT *et al.* (1990) relataram a presença de IgE total e IgG4 específica contra cisticercos de *T. solium* em soro e LCR de indivíduos com NC. HUANG *et al.* (2002) encontraram positividade de 97,8% para IgG4 em soro de pacientes com NC utilizando anticorpos monoclonais direcionados para a captura desse isótipo e observaram que a queda dos níveis de IgG4 está relacionada com a progressão do tratamento e melhoria da sintomatologia dos pacientes. MALLA *et al.* (2005) encontraram em ELISA frente a antígenos de *T. crassiceps*, utilizando soro de pacientes com NC em tratamento com albendazol por 1, 3 e 6 meses, a sensibilidade de 71,4% para IgG1 e 68,2% para IgG4, sendo a especificidade para ambos isótipos de 90,2%.

2.6. DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

O diagnóstico da NC é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. As mais variadas técnicas imunológicas são empregadas com alta eficiência, porém ainda são dependentes da manutenção dos cistos do parasita em modelo animal para obtenção dos extratos antigênicos. De forma geral, as técnicas enzimáticas apresentam-se como ferramentas de grande utilidade no diagnóstico da cisticercose e em estudos epidemiológicos. A elaboração de ensaios com frações purificadas e antígenos recombinantes pode aumentar a eficiência dos testes de modo a incrementar a sensibilidade e especificidade dos ensaios, favorecendo a aplicação dos imunoensaios na rotina laboratorial, tanto em amostras humanas de soro e LCR, quanto em amostras de soro de suínos.

2.6.1. Pesquisa de anticorpos

Inicialmente os métodos utilizados para detectar anticorpos anti-cisticercos no soro e LCR abrangiam a reação de fixação do complemento (reação de Weinberg), hemaglutinação indireta e imunofluorescência (LIVRAMENTO, 1980; MOSES, 1911; NIETO, 1956). Com o passar dos anos, a detecção de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* por *Enzyme Linked Immusorbent Assay* (ELISA) e Imunoblot tornaram-se os métodos mais utilizados para o diagnóstico da cisticercose humana e suína (ESPINDOLA *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2007; ITO *et al.*, 1998; TSANG, BRAND & BOYER, 1989).

O ELISA realizado com antígeno bruto de cisticercos de *T. solium* com amostras de soro e LCR de pacientes com NC apresentou índices de sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 70,6% e 80% para soro e de 94,1% e 100%, para LCR (BUENO *et al.*, 2000). Entre os diferentes antígenos estudados, aqueles ricos em glicoproteínas (GP) foram os que apresentaram melhores resultados (FELDMAN *et al.*, 1990; ITO *et al.*, 1998; PERALTA *et al.*, 2002; PLANCARTE *et al.*, 1999; RESTREPO *et al.*, 2000; RODRIGUEZCANUL *et al.*, 1997; TSANG, BRAND & BOYER, 1989).

TSANG, BRAND & BOYER (1989) obtiveram um grupo de sete glicoproteínas (GP) com pesos moleculares de 50-, 42 a 39-, 24-, 21-, 18-, 14- e 13 kDa de *T. solium* a partir de purificação de antígenos de cisticerco deste parasita em coluna de afinidade contendo lentil-lectina. Utilizando-se estas GP em Imunoblot frente a soro e LCR de pacientes com NC foram obtidos índices de sensibilidade de 98% e especificidade de 100%, sendo as GP42 e GP24 as mais frequentemente reconhecidas. Dessa forma, a Organização Panamericana de Saúde reconheceu este Imunoblot, denominado EITB LLGP pelos autores, para o uso no diagnóstico sorológico da NC em amostras de soro, embora se deva ressaltar que este ensaio apresentou somente 25% de sensibilidade em pacientes com um único cisto (WILSON *et al.*, 1991).

2.6.2. Antígenos alternativos

O uso de antígenos obtidos a partir de cisticercos de *T. solium* foi de grande valia para o desenvolvimento das técnicas imunológicas utilizadas até os dias de hoje no diagnóstico laboratorial da NC. No entanto, existem algumas dificuldades para a sua obtenção, tais como: necessidade de animais de médio porte, falta de homogeneidade ou quantidade para a garantia da qualidade dos lotes, baixo rendimento, rompimento dos cisticercos no momento da sua retirada do músculo e contaminação antigênica com proteínas dos suínos, tornando inviáveis os procedimentos de purificação (ESPINDOLA, 2004) além de serem considerados trabalhosos e de baixo rendimento (RESTREPO *et al.*, 2000).

Dessa forma muitos antígenos alternativos vêm sendo desenvolvidos e utilizados na tentativa de obter um ensaio imunológico cada vez mais eficiente e específico para o imunodiagnóstico da NC, sejam estes antígenos purificados (ESPINDOLA *et al.*, 2005), peptídeos sintéticos (BUENO *et al.*, 2005; FERRER *et al.*, 2005) e/ou antígenos recombinantes (HANCOCK *et al.*, 2003; MONTERO *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2006).

2.6.2.a. Antígeno heterólogo de *T. crassiceps* para pesquisa de anticorpos

A larva de *T. crassiceps* possui reprodução assexuada por meio de brotamentos a partir da membrana, podendo ser facilmente mantida em peritônio de camundongo (LARRALDE *et al.*, 1989; VAZ *et al.*, 1996). Devido às suas propriedades biológicas, constitui um importante modelo laboratorial para o desenvolvimento de antígenos para o diagnóstico da NC (BUENO *et al.*, 2000). LARRALDE *et al.* (1990) demonstraram a reatividade cruzada entre o antígeno obtido de cisticercos de *T. crassiceps* e anticorpos anti-*T. solium* presentes em amostras de LCR de pacientes com NC.

Outros estudos demonstraram que frações antigênicas presentes nas diferentes espécies de *T. saginata*, *T. solium* e *T. crassiceps*, possuem homologia parcial (CHUNG *et al.*, 1999; PERALTA *et al.*, 2002; ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN, 1994), abrindo a possibilidade para a utilização de antígenos heterólogos, como o de cisticercos de *T. crassiceps*, no diagnóstico laboratorial da NC.

O ELISA com o líquido vesicular de *T. crassiceps* (LVTcra) demonstrou índices de sensibilidade com soro e LCR de pacientes com NC de, respectivamente, 91,2% e 95,6% e especificidade de 80% e 100%. A técnica de Imunoblot revelou que as proteínas de 131-, 121-, 109-, 74-, e menores ou iguais a 62 kDa (62-, 55-, 47-, 41-, 39-, 35-, 30-, 28-, 25-, 22-, 19-13-, e 12 kDa) foram consideradas específicas para NC (BUENO *et al.*, 2000).

PERALTA *et al.* (2002) sugeriram que a fração purificada de 14 kDa do antígeno de *T. crassiceps* possa ser empregada na detecção de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* em amostras de soro para levantamentos epidemiológicos e também para a triagem de pacientes com cisticercose. Adicionalmente, ESPINDOLA *et al.* (2005) ao utilizarem ELISA com frações proteicas de 18- e 14 kDa purificadas de líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* (proteína18/14) e soros de pacientes com NC e de indivíduos supostamente saudáveis, obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, pôde-se estabelecer a importância das proteínas de 18- e 14 kDa de *T. crassiceps* no diagnóstico da NC.

2.6.2.b. Antígenos recombinantes

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos visando melhorias no imunodiagnóstico da NC utilizando várias preparações antigênicas, que vão desde os extratos brutos dos parasitas, antígenos comuns compartilhados entre as *Taenia sp.*, antígenos purificados das mais variadas formas, peptídeos sintéticos até antígenos recombinantes (ITO & CRAIG, 2003).

Para aplicação em imunoensaios para NC humana têm sido produzidos antígenos recombinantes de *T. solium* (CHUNG *et al.*, 1999; KALINNA & McMANUS, 1996; HUBERT *et al.*, 1999; MANOUTCHARIAN *et al.*, 1999; MAYTA *et al.*, 2006, 2007; MONTERO *et al.*, 2003; DA SILVA *et al.*, 2006;), *T. saginata* (FERRER *et al.*, 2007a) e *T. crassiceps* (FISCHER *et al.*, 1994; GEVORKIAN *et al.*, 1996; ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN, 1994). No entanto, algumas dificuldades ainda são enfrentadas, como a não eliminação de epítomos de reatividade cruzada, talvez por impedimentos nos processos de purificação das proteínas recombinantes (GREENE *et al.*, 2000) e/ou o sistema de expressão escolhido e suas modificações pós-transducionais (HANCOCK *et al.*, 2008), além da menor sensibilidade obtida com uso desses recombinantes em relação aos extratos totais. Portanto, há ainda um caminho a percorrer na identificação do(s) epítomo(s) imunodominante(s), na clonagem gênica adequada, na expressão desses antígenos, e finalmente, na purificação adequada que garanta a preservação da conformação antigênica específica.

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico sorológico da NC e obter um reagente simples, reprodutível e com fonte antigênica inesgotável, o uso de antígenos recombinantes torna-se uma alternativa atraente para a padronização de novos ensaios, apresentando ainda vantagens como diminuição da variação lote a lote e a ausência de animais de médio ou pequeno porte para a manutenção dos cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps*, respectivamente (ROBLES *et al.*, 2005).

CHUNG *et al.* (1999) demonstraram que o antígeno recombinante obtido proveniente de *T. solium*, denominado rTsM10, foi efetivo no sorodiagnóstico de pacientes com NC por Imunoblot, no entanto essa proteína não foi efetiva quando

utilizada em teste ELISA. LEE *et al.* (2005) expressaram a sequência gênica correspondente a essa proteína em sistema eucarioto, possibilitando glicosilação, obtendo 91% de positividade no ELISA. Já KYNGDON *et al.* (2006) estudaram a imunização de suínos com as proteínas recombinantes TSOL18 e TSOL45-1A, baseadas em antígenos da oncosfera de *T. solium* e relataram o aparecimento de anticorpos específicos anti-cisticerco de *T. solium*. Resultado semelhante foi encontrado por GAUCI *et al.* (2006) utilizando antígenos recombinantes obtidos a partir de *T. solium* e *T. ovis* na imunização dos suínos.

Adicionalmente, FISHER *et al.* (1994) salientaram que a aplicação de antígenos recombinantes em estudos soropidemiológicos e diagnóstico não deve se limitar apenas para NC, mas também para teníase.

FERRER *et al.* (2009) demonstraram que o antígeno Ts8B2-GST, oriundo de *T. solium*, apresentou maior sensibilidade em ELISA ao utilizar soro ao invés de LCR de pacientes com NC, independentemente do sistema de expressão no qual a proteína foi obtida.

Diferentes estudos realizados com proteínas recombinantes para o diagnóstico da cisticercose (rGP50 e T24H) e da teníase (rES38 e rES33), somadas aos peptídeos sintéticos (sTsRS1, sTS18var 1, sTS14) utilizados em ELISA e/ou Imunoblot apresentaram resultados promissores (BUENO *et al.*, 2005; HANCOCK *et al.*, 2003, 2004, 2006; LEVINE *et al.*, 2004). HANDALI *et al.* (2010) avaliaram os antígenos acima citados na detecção de anticorpos em dot-ELISA, sendo que o antígeno recombinante rGP50 foi o único não reconhecido por soro de pacientes com esquistossomose, mostrando-se o mais específico dentre os antígenos avaliados.

Alguns antígenos recombinantes podem ser considerados como bons candidatos para a análise com amostras de LCR e soros de pacientes com NC, como os baseados em *T. solium*, TsM (CHUNG *et al.*, 1999), Ag1V1/Ag2 (SAKO *et al.*, 2000), G-F18 (MONTERO *et al.*, 2003), rGP 50 (HANCOCK *et al.*, 2004; BUENO *et al.*, 2005); e os obtidos a partir de *T. crassiceps*, TcMet-1, TcMet-2 (FISCHER *et al.*, 1994) e Ketc7 (MANOUTCHARIAN *et al.*, 1996), sendo este último também estudado para o desenvolvimento de vacinas para suínos (MANOUTCHARIAN *et al.*, 2004). HERNANDEZ *et al.* (2007) relataram imunidade protetora em 97% dos camundongos

imunizados com antígeno recombinante obtido, além de LIGHTOWLERS, ROLFE & GAUCI (1996) e LIGHTOWLERS (1999) que utilizaram duas proteínas recombinantes a partir de *T. saginata* bastante imunogênicas para o gado, apresentando 99,8% de proteção em bovinos infectados experimentalmente. Já na imunização de suínos, MAYTA *et al.* (2007) geraram a proteína recombinante Tso31, correspondente à proteína exclusiva da oncosfera de *T. solium*. Sua utilização na vacinação de 8 suínos proporcionou imunidade a dois animais. LUO *et al.* (2009) produziram a proteína recombinante 45W-4B relacionada à oncosfera de *T. solium* e obtiveram redução de 97% da carga parasitária. FLISSER *et al.* (2004) relataram que as proteínas recombinantes TSOL18 e TSOL45-1A mostraram proteção próxima a 100% em suínos infectados experimentalmente.

A partir da revisão da literatura, verifica-se que há um campo aberto para estudos de antígenos recombinantes a serem utilizados no diagnóstico da NC. A busca deve ser por aqueles que sejam altamente reativos para o emprego no diagnóstico laboratorial, com o anseio de maiores sensibilidades e especificidades, já que os resultados publicados não apresentam índices de desempenho suficientes para serem utilizados exclusivamente no diagnóstico da NC.

Desta forma, o uso de antígenos recombinantes poderá ser uma alternativa viável para o imunodiagnóstico da NC, com a vantagem de não utilizar animais experimentais. Possibilitará, ainda, o diagnóstico da NC para os diversos centros hospitalares, aumentando a disponibilidade de diagnóstico e acompanhamento do tratamento dos pacientes, além da utilização em estudos soropidemiológicos em todo o Brasil para indicar a verdadeira prevalência do complexo teníase-cisticercose.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção, caracterização e estudo da reatividade de antígeno recombinante de *T. crassiceps* em testes imunoenzimáticos (ELISA e Imunoblot) para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* em LCR e soro de pacientes com NC.

3.2. ESPECÍFICOS

- Gerar em *Escherichia coli* proteína recombinante correspondente às proteínas de Líquido Vesicular de *T. crassiceps*;
- Caracterizar a reatividade da proteína recombinante gerada frente a anticorpos monoclonais e soro/LCR de pacientes com NC utilizando ELISA e/ou Imunoblot;
- Verificar a antigenicidade da proteína recombinante comparativamente a diferentes antígenos provenientes de *T. solium* e *T. crassiceps*;
- Avaliar a produção de citocinas e a indução de linfoproliferação induzida pelo antígeno recombinante *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes e soluções utilizados para a realização deste trabalho estão contidos no ANEXO I.

4.1. AMOSTRAS DE SORO E LCR

As amostras envolvidas neste estudo fazem parte da soroteca do laboratório de imunologia clínica, tendo sido utilizadas em projetos anteriores do nosso grupo.

A coleta das referidas amostras foi realizada de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, vigentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), após parecer favorável da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FCF/USP nº 188/2003, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10 DE OUTUBRO DE 1996). A utilização da soroteca para a realização deste projeto foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa CEP nº 468/2008 (ANEXO II).

As 55 amostras de soro constituintes do grupo controle negativo foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) de indivíduos que não relatavam sintomas clínicos e que estavam realizando exames de rotina. As amostras de LCR do grupo controle negativo constituíram 35 amostras de outras patologias que não a cisticercose.

Foram cedidas pelo Prof^o. Dr. Luís dos Ramos Machado e Prof^o. Dr. José Antônio Livramento (pertencentes ao Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo) 41 amostras de soro e 29 amostras de LCR de pacientes com neurocisticercose. Baseando-se nos critérios de diagnóstico da NC desenvolvidos por DEL BRUTTO *et al.* (2001), estas amostras foram classificadas como provenientes de pacientes com “diagnóstico absoluto” e “confiabilidade definitiva”, devido haver a prévia demonstração histológica do parasita, visualização direta do parasita na fundoscopia ou evidências de lesões císticas demonstrando o escólex na tomografia computadorizada ou ressonância magnética nuclear.

O grupo denominado outras parasitoses constituiu-se de 24 amostras de soro oriundas de pacientes com hidatidose cedidas gentilmente pela Prof^a. Dra. Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Catorze amostras de soro cedidas pela Prof^a. Dra. Márcia Imenes - UFSC, Santa Catarina, sendo as mesmas compostas por duas amostras de paciente com *Ascaris lumbricoides*, uma amostra de paciente com *Giardia lamblia*, oito amostras de pacientes com *Strongyloides stercoralis*, duas amostras de pacientes com *Schistosoma mansoni* e uma amostra de pacientes com *Entamoeba histolytica*. Foram ensaiadas também 14 amostras de soros de pacientes com teníase, cedidas pelo Prof^o. Dr. Antônio Augusto Mendes Maia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), em Pirassununga, SP.

4.2. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO RECOMBINANTE

4.2.1. Processos de clonagem

4.2.1.1. Extração de RNAm

As larvas de *T. crassiceps* foram retiradas assepticamente de camundongos fêmeas BalB/c após 90 dias do inóculo com cisticercos do parasita. Seguiu-se lavagem em PBS estéril. Aproximadamente 200 mg de larvas foram transferidas para tubo de microcentrífuga e adicionou-se 500 µL de Trizol (Invitrogen, Grand Island, EUA), com posterior homogeneização até a dissolução completa dos cistos. Na sequência, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), com agitação vigorosa por 15 segundos e incubação por 15 minutos em repouso a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 15.700 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao sobrenadante foram adicionados 500 µL de isopropanol (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), seguido por centrifugação a 15.000 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado foi seco a temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspensionado em 50 µL de água RNase free. O

material obtido foi estocado a -20°C . A concentração do RNAm foi avaliada em espectrofotômetro (DU 640 spectrophotometer, Beckman, CA, EUA) a 260 e 280 nm.

4.2.1.2. Obtenção do cDNA

A reação de RT-PCR foi realizada utilizando-se um kit comercial *Reverse Transcription System* (Promega Corporation, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.1.3. Amplificação do DNA por PCR

A sequência de nucleotídeos obtida por meio de amplificação por PCR a partir do cDNA gerado conforme o descrito no item 4.2.1.2, foi correspondente aos aminoácidos 1 ao 85 da fração derivada de *T. crassiceps* (acesso no gene bank: U07150). A reação de PCR foi realizada com os seguintes primers: 5'- CCG GAA TTC ATG AGG GCA TCC ATC TTT -3' (senso) e 5'- CCG CAA GCT TGG CTA TTC ATT TTC AAG ACC CTT-3' (anti-senso) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), baseados na sequência publicada por ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994). As porções sublinhadas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso indicam sítios para as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) respectivamente.

4.2.1.4. Purificação do produto de PCR

O produto de PCR foi purificado utilizando o kit comercial *Min Elute PCR Purification* (QIAGEN, Freiburg, Alemanha) e ligado, inicialmente, ao vetor comercial *pMOS Blue blunt ended cloning kit* (Amersham Bioscience, Pittsburgh, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.1.5. Transformação de bactérias DH5 α competentes com DNA plasmidial

Para a transformação, 4 μL do produto da ligação foram adicionados a tubos de microcentrífuga contendo 100 μL de bactérias *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, EUA) competentes, seguido de incubação por 30 minutos em gelo. Após este período, os tubos foram colocados a 42°C por 2 minutos e reincubados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 400 μL de meio SOC e transcorreu-se incubação a 37°C por 1 hora, sob agitação, a 200 rpm. O volume total da mistura foi semeado em placas de ágar LB (Gibco, Auckland, Nova Zelândia) suplementado com 35 μL de X-gal (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 20 μL de 0,1 M isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina (USB, Cleveland, EUA) e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tetraciclina (USB, Cleveland, EUA). Posteriormente, foi realizada incubação a 37°C por 16-18 horas.

4.2.1.6. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina

Após transformação das bactérias competentes com os produtos de ligação, as bactérias contendo DNA plasmidial (correspondentes às colônias brancas) foram selecionadas, sendo os plasmídeos extraídos conforme descrito abaixo e analisados por digestão com enzimas de restrição.

Resumidamente, células bacterianas foram cultivadas em 3 mL de meio LB (USB Corporation, Cleveland, EUA) contendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina (Gibco, Grand Island, EUA) por 16-18 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm. As células foram recolhidas após centrifugação a 9.300 $\times g$ por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas em 200 μL da solução **A**, misturada duas vezes por inversão, e adicionadas com 400 μL da solução **B** seguida de incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 400 μL da solução **C**, e, após leve agitação, seguiu-se incubação em gelo por 20 minutos. O material foi, então, centrifugado a 15.700 $\times g$ por 20 minutos a temperatura ambiente, e transferiu-se 800 μL do sobrenadante para outro tubo contendo 600 μL de isopropanol (Merck, Schudart,

Alemanha). Cada tubo foi agitado 10 vezes por inversão e incubado a -20°C por 2 horas, com posterior centrifugação a $15.700 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol (Merck, Schudart, Alemanha) a 70% gelado, centrifugado a $15.700 \times g$ por 5 minutos a 4°C e deixado secar a temperatura ambiente. O precipitado obtido foi dissolvido em 30 μL de água contendo RNase (Sigma-Aldrich, Sleinhelm, Alemanha) para uma concentração final de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com posterior incubação de 30 minutos a 37°C . Cada material obtido da extração foi analisado por corrida eletroforética em gel de agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 1,5%.

4.2.1.7. Digestão enzimática

Para a análise da presença do inserto foi realizada digestão enzimática dupla com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e o resultado foi analisado em gel de agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 1,5%.

4.2.1.8. Sequenciamento do DNA

A sequência de nucleotídeos de três clones que apresentaram insertos do tamanho esperado foi confirmada através de sequenciamento automático utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Pharmacia, Pittsburg, EUA) e o sequenciador mega BAGETM 1000 (Pharmacia, Pittsburg, EUA) do Serviço de Sequenciamento do Instituto de Biologia da USP. Os *primers* utilizados foram: T7 5'-ATA CGA CTC ACT ATA GGG-3' (senso) e U19 5'-GGG TTT TCC CAG TCA CGA -3' (anti-senso) (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshie, Reino Unido).

A análise do sequenciamento procedeu-se através do pacote DNASTAR versão 5.0 (DNASTAR Inc.). O alinhamento entre o resultado obtido e a sequência pTcA5 (ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN, 1994) foi realizado utilizando-se o programa Clustal W.

4.2.1.9. Subclonagem do inserto em vetor para expressão em bactérias

Após confirmação do gene por sequenciamento, o inserto correspondente foi removido do vetor *pMOS* por digestão enzimática com *EcoRI* e *HindIII*. Sua extração do gel de agarose a 1,5% deu-se com a utilização do *Gene Clean II kit* (QBiogene, Irvine, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. O inserto purificado foi ligado ao vetor pHIS (pET-22b paralelo I modificado por SHEFFIELD *et al.*, 1999), que permite a obtenção da proteína recombinante fusionada à histidina (His₆, N-terminal).

4.2.1.10. Transformação de bactérias competentes com DNA plasmidial

Os produtos de ligação, obtidos conforme o descrito acima (item 4.2.1.9), foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α (item 4.2.1.5) e o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (item 4.2.1.6). Após a análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para verificação da presença do inserto (item 4.2.1.7) foram escolhidos randomicamente dois clones para análise de expressão.

Dessa forma, os clones foram submetidos à transformação de acordo com o protocolo do item 4.2.1.5, com as seguintes modificações: as linhagens bacterianas utilizadas neste procedimento foram a *E. coli* DE3: BL-21 (Stratagene, La Jolia, Canadá), Rosetta-gami (Novagen, Madison, EUA), pLys S (Promega Corporation, Madison, EUA), Ril (Stratagene, La Jolia, Canadá) e BL21-Rp (Stratagene, La Jolia, Canadá), enquanto que o material genético foi o vetor pHis contendo o inserto.

4.2.2. Obtenção da proteína recombinante

4.2.2.1. Escolha da melhor linhagem de bactéria para expressão

Após a transformação e obtenção dos clones recombinantes, seguiu-se a indução da expressão proteica em pequena escala utilizando isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Foram testadas as bactérias transformadas *E. coli* DE3: BL-21, Rosetta-gami, pLys S, Ril e BL21-Rp em meio LB

(Gibco, Auckland, Nova Zelândia) com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina para *E. coli* DE3 BL21 e com $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ cloranfenicol (USB, Cleveland, EUA) para as demais linhagens.

As culturas selecionadas foram diluídas (1:50) e induzidas com 0,01mM ou 0,1 M de IPTG (Invitrogen, Carlsbad, EUA) por 3,5 horas a 30°C ou 37°C sob agitação de 200 rpm. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação a $4.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em tampão de lise. Seguiram-se 3 ciclos de sonicação de 15 segundos em banho de gelo. O extrato bacteriano foi centrifugado a $18.000 \times g$ por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante e o precipitado foram analisados em SDS-PAGE a 15% corado por Coomassie *Blue* e por Imunoblot com anticorpo monoclonal anti-histidina (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido).

4.2.2.2. Imunoblot com anticorpo monoclonal anti-histidina

As proteínas separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE a 15% foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond N-Amersham Bioscience, Pittsburgh, EUA) a 100 V por 1h utilizando o equipamento *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad, Filadélfia, EUA). Para verificação da eficiência da transferência foi utilizado Ponceau-S (USB, Cleveland, EUA) a 0,1% em ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%.

Foi utilizada como solução de bloqueio e diluente dos anticorpos primários e secundários: leite (desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Após a transferência, seguiu-se o bloqueio dos sítios reativos utilizando-se a referida solução de bloqueio por 16 a 18h a 4°C. Após este período, seguiu-se a adição do anticorpo monoclonal (AcMo) anti-histidina diluído a 1:1000 e incubação por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após lavagens, a membrana foi incubada por 1 hora com conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma, St. Louis, EUA) diluído a 1:2000. As lavagens foram repetidas, e a reação foi revelada tanto por quimioluminescência, utilizando-se o kit ECL + Plus (Amersham Bioscience, Pittsburgh, EUA), quanto por método colorimétrico, utilizando-se a solução cromogênica de 4-cloro- α -naftol/ H_2O_2 (Sigma, St. Louis, EUA).

Após todas as incubações, foram realizados 3 ciclos de lavagens com PBS-T de 10 minutos cada.

4.2.2.3. Expressão da proteína recombinante

Bactérias *E. coli* da linhagem BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante e as condições ótimas de lise e expressão foram estabelecidas em pequena escala de crescimento bacteriano (10 mL). A concentração apropriada de IPTG (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para indução da expressão foi estabelecida após estudos dose-resposta (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mM de IPTG) em diferentes temperaturas de indução (30°C e 37°C). Estudos cinéticos de tempo de indução (3 - 18h) com IPTG (Invitrogen, Carlsbad, EUA) também foram realizados utilizando-se a cepa de *E. coli* selecionada. Tampões de lise acrescidos ou não de Triton a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram testados. Em todos os tampões foi adicionado 1 mg. mL⁻¹ de lisozima (Sigma, St. Louis, EUA) e 1 mM de fenilmetilsulfonil fluorídrico (PMSF, Sigma Chem. Co., St Louis, EUA). As condições de lise das bactérias por sonicação em banho de gelo (3 ciclos de 30 segundos em intervalos de 30 segundo entre os ciclos) foram também estabelecidas com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier mod. 450, EUA). As frações obtidas (precipitados e sobrenadantes) foram analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE 15% utilizando equipamento *Mini PROTEAN® 3 cell* (Bio-Rad, Philadelphia, EUA) na presença de 2-mercaptoetanol (Sigma, St. Louis, EUA) e coradas por Coomassie *Blue* (USB Corporation, Cleveland, EUA). As proteínas foram detectadas por Immunoblot (item 4.2.2.2) com AcMo anti-histidina (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido). Por fim, as bactérias clonadas foram induzidas com 0,4 mM IPTG, por 16-18 horas a 37°C a 200 rpm. Após este período, as células foram precipitadas por centrifugação a 5.000 x *g* por 30 minutos a 4°C, e ressuspensas em tampão de lise, seguido de 4 ciclos de sonicação de 15 segundos em banho de gelo.

4.2.2.4. Purificação da proteína recombinante em resina de cobalto ou níquel

O sobrenadante obtido após a expressão foi fracionado, sendo parte aplicada lentamente em resina de níquel (GE Healthcare, Suíça) e de cobalto (BD Biosciences Systems, New Jersey, EUA) previamente equilibradas com tampão de equilíbrio. Em seguida as resinas foram lavadas com o tampão de lavagem de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem, as colunas foram submetidas a aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol (0; 15; 30; 50; 80; 100; 150; 200; 250 e 400 mM) para ambas as resinas, sendo as alíquotas recuperadas em volume de 2 mL e analisadas em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie *Blue* e por Immunoblot utilizando o anticorpo anti-histidina (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido), conforme descrito acima no item 3.2.2.2, para o estabelecimento da concentração ideal de imidazol para a eluição da proteína recombinante. As frações eluídas a 400 mM de imidazol em coluna de níquel foram reunidas e dialisadas contra PBS contendo 1 mM PMSF (Sigma Chem. Co, St Louis, EUA).

4.2.2.5. Dosagem do antígeno recombinante

Os eluatos foram dosados por Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o kit *Bio Rad Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, EUA) segundo as orientações do fabricante.

4.2.3. Avaliação da proteína recombinante em imunoensaios

4.2.3.1. Caracterização do antígeno recombinante frente a anticorpos monoclonais

Foram produzidos AcMo anti-*T. crassiceps* (anti-líquido vesicular e anti-antígeno de excreção e secreção) e AcMo anti-*T. solium* (anti-líquido vesicular, anti-antígeno total e anti-antígeno de escólex) por ESPÍNDOLA *et al.* (2000).

O Immunoblot foi realizado de acordo com ESPÍNDOLA *et al.* (2000), sendo utilizado 1,0 µg de antígeno por mm.

4.2.3.2. Perfil de reatividade da proteína recombinante por Immunoblot utilizando amostras de soro e LCR

Para realização do processo de transferência foi utilizado 1,0 µg de antígeno/ mm. Após a separação eletroforética, a proteína recombinante foi transferida para membrana de nitrocelulose (Hybond N-Amersham Bioscience, Pittsburgh, EUA) a 100 V por 1h usando equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad, Filadélfia, EUA). A eficiência da transferência foi checada pela coloração da membrana de nitrocelulose com Ponceau-S (USB, Cleveland, EUA) a 0,1% em ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm, lavadas em água destilada e em solução de lavagem e bloqueados os sítios reativos remanescentes durante 2 horas em tampão de bloqueio sob agitação constante a temperatura ambiente. Para pesquisa de anticorpos IgG, as amostras foram diluídas a 1:50 em solução diluente e incubadas durante 18 horas a 4°C, sob constante e leve agitação. Após a incubação das amostras, seguiram-se lavagens com PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween sob agitação a temperatura ambiente. Seguiu-se a adição do anticorpo conjugado anti-IgG humana marcado com biotina (Sigma Chemical Company, EUA) diluído a 1:1000, com incubação de 1 hora. Após a lavagem foi adicionado o conjugado avidina peroxidase (Sigma Chemical Company, EUA) diluído a 1:2000 e incubado por 1 h. Todas as incubações, com exceção da realizada com amostra, foram realizadas a temperatura ambiente. A reação foi revelada com solução cromogênica 4-cloro- α -naftol/H₂O₂ (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) sob agitação constante até o aparecimento das bandas reativas e, então, bloqueada com água destilada.

4.2.3.3. ELISA

4.2.3.3.a. Padronização de ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* em soro e LCR

Para os ensaios de padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG foram utilizadas 3 amostras de soro de pacientes com NC e 3 amostras de soro de indivíduos saudáveis para a doença em questão, enquanto que para LCR foi utilizado *pool* de 5 amostras de indivíduos acometidos pela NC e *pool* de cinco LCR de indivíduos saudáveis para esta patologia.

Placas de microtitulação de 96 cavidades com fundo plano Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com o antígeno recombinante diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,5M pH 9,6 e incubadas a 4°C durante 15 a 18 horas em câmara úmida. Foram testadas as seguintes concentrações de antígeno para LCR: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,0125 µg/poço, enquanto que para soro as respectivas concentrações foram de: 0,5; 0,3; 0,15 e 0,05 µg/poço. As placas foram bloqueadas com solução de leite a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 e incubadas por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio, foram adicionadas amostras em diferentes diluições: LCR (1:50, 1: 100 e 1:200) e soro (1:50, 1: 100, 1:200 e 1:400) em solução de leite a 5% com PBS-T, de forma similar ao reagente utilizado no bloqueio, e incubadas por 1 hora a 37°C. Adicionou-se anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company, EUA) diluído a 1:1000, 1:2000 e 1:3000 para soro e 1:2000, 1:3000 e 1:4000 para LCR na mesma solução diluente da amostra. Após a adição do conjugado, seguiu-se incubação a 37°C por 1 hora. A solução substrato-cromogênica utilizada foi ortofenilenodiamina (OPD, Sigma Chem. Co., EUA) adicionada de H₂O₂ a 30% (Merck, Alemanha). A reação enzimática foi interrompida após 15 minutos com ácido sulfúrico 4N e a intensidade de coloração quantificada em leitor de placas (SLT-Spectra, Salzburg, Áustria) em comprimento de onda 492 nm.

4.2.3.3.b. ELISA

O ELISA foi realizado utilizando-se 0,5 µg e 0,3 µg do antígeno Tc14/poço, respectivamente, para LCR e soro. Para sensibilização das placas de microtitulação de 96 cavidades com fundo plano Costar® (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foi utilizada 100 µL da diluição do antígeno em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, seguida de incubação por 18 h a 4°C em câmara úmida.

O bloqueio deu-se com solução de leite (desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 por 2 horas a 37°C. Após o bloqueio foram adicionadas amostras de LCR ou soro, diluídas, respectivamente, a 1:50 ou 1:100, seguidas de incubação por 1 hora a 37°C. Adicionou-se anti-IgG humano marcado com peroxidase (Sigma Chemical Company, EUA) diluído a 1:2000 para LCR ou 1:1000 para soro. Após 1 hora de incubação a 37°C, adicionou-se a solução substrato-cromogênica OPD (Sigma, St. Louis, EUA, Sigma Chem. Co EUA) e H₂O₂ a 30% (Merck). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de uma solução contendo ácido sulfúrico (H₂SO₄) 4 N. Todas as incubações, com exceção da realizada após a adição do substrato cromogênico, foram seguidas de lavagens com PBS-T, sendo que após as etapas de sensibilização e bloqueio foram realizados 4 ciclos, enquanto que após a incubação com as amostras e utilização do conjugado foram realizados sete ciclos.

Os ensaios foram monitorados pela adição de padrões, constituídos de amostras provenientes do grupo controle positivo e negativo, que foram utilizadas repetidamente a cada ensaio realizado. A medida das absorbâncias da amostra “padrão” controle negativo foi utilizada para o cálculo do índice de reatividade, sendo este: absorbância da amostra em estudo/ média das absorbâncias da amostra padrão.

O *cut off* para LCR foi calculado através da média dos índices de reatividade obtidos entre as amostras do grupo controle negativo acrescida de 3 desvios padrões. O mesmo se deu para soro (gerando o *cut off* b), porém, para análise do ELISA utilizando soro, também foram calculados mais dois limiares de reatividade, buscando a máxima sensibilidade (*cut off* c) e o maior índice de especificidade (*cut off* a), respectivamente.

4.2.3.4. Comparação de testes sorológicos utilizando diferentes antígenos frente a amostras de soro de pacientes com NC

Para a comparação da reatividade de amostras de soro em ELISA e Imunoblot, foram utilizados diferentes antígenos.

A obtenção do antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps* (LVTcra) deu-se segundo VAZ *et al.* (1997), resumidamente os parasitas foram mantidos por inoculação intraperitoneal de 5-10 vesículas pequenas sem brotamento visíveis, em camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas. Os parasitas foram obtidos após 90 dias, da cavidade peritoneal de animais com aumento de volume abdominal. Os cisticercos íntegros foram rompidos com auxílio de bastão de vidro e centrifugados a $15.000 \times g$, durante 10 minutos a 4°C. Após centrifugação, seguiu-se a coleta do sobrenadante, que foi submetido a tratamento por ultrassom (Ultrasonic Power Unit MSE, EUA) de 4 ciclos de 30 segundos a 1mA e 20kHz, em banho de gelo. A mistura foi centrifugada duas vezes a $10.000 \times g$ durante 30 minutos a 4°C e o último sobrenadante constituiu o extrato antigênico LVTcra. Ao antígeno obtido adicionou-se inibidor de proteases. O Imunoblot utilizando esse antígeno foi realizado segundo o descrito por BUENO *et al.* (2000).

O antígeno 18/14 kDa (18/14Tcra) foi obtido por ESPÍNDOLA *et al.* (2005). Resumidamente, o antígeno LVTcra gerado segundo procedimento acima descrito foi processado em coluna de afinidade com AcMo anti-LVTcra (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005). O antígeno resultante da purificação constituiu a proteína 18/14Tcra. Sendo o ELISA e o Imunoblot realizados conforme o descrito por ESPÍNDOLA *et al.* (2005).

O antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps* (ES) foi obtido por GOEBBELS (2008) a partir de cisticercos do referido parasita. Resumidamente, após lavagens sucessivas com PBS estéril na proporção 1:10, foram adicionados aproximadamente 1000 cistos em frascos estéreis e 10 mL de Tris (USB Corporation, Cleveland, EUA) a 9mM, pH 7,2 com 1 mM de EDTA (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após repouso de 3 horas, o sobrenadante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C, sendo posteriormente passado em filtro de 45 μ m e submetido a tratamento por ultrassom (Ultrasonic Power Unit - MSE, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1 mA e 20

kHz, em banho de gelo, constituindo o extrato antigênico ES. Sendo o Immunoblot realizado segundo GOEBBELS (2008).

O extrato salino total de *T. solium* foi obtido por BUENO *et al.* (2000), segundo metodologia descrita por COSTA *et al.* (1982) com algumas modificações. Os cisticercos íntegros de *T. solium* após liofilização foram reconstituídos em salina (1 mL/100 mg pó) e homogeneizados em banho de gelo por 5 minutos. O Immunoblot foi realizado segundo o descrito por BUENO *et al.* (2000).

Foram utilizadas membranas contendo o Ag de *T. solium* purificado por cromatografia de afinidade em coluna de lentil-lectina (TSANG, BRAND & BOYER, 1989) provenientes do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Atlanta, EUA, cedidas pelo Prof^o Dr. Victor C. W. Tsang. Segundo TSANG, BRAND & BOYER (1989) os cisticercos de *T. solium* após homogeneização, centrifugações sucessivas e sonicação, originaram sobrenadante que foi purificado em coluna de sefarose G25 (Pharmacia, Pittsburg, EUA) e concentrado por ultrafiltração a 250.000 x g em membrana YM-20 (Amicon, Danvers, EUA). O Immunoblot foi processado de acordo com TSANG, BRAND & BOYER (1989), sendo considerado reagente quando apresentou reatividade com pelo menos um dos peptídeos de 50-, 39-42-, 24-, 21-, 18-, 14- e 13 kDa.

4.2.4. Imunoestimulação promovida pelo antígeno recombinante *in vitro*, dosagem de citocinas e isotipagem

4.2.4.1. Linfoproliferação

Células mononucleares do sangue periférico de 10 pacientes com NC e de 11 indivíduos do grupo controle negativo foram isoladas a partir de 20 mL de sangue venoso coletado em tubos a vácuo contendo heparina como anticoagulante. A separação foi realizada através do gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, EUA), que é uma solução de polissacarose e diatrozoato de sódio, com densidade de $1,077 \pm 0,001 \text{ g.mL}^{-1}$. As amostras de sangue heparinizadas foram adicionadas, cuidadosamente, ao Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, EUA) na proporção

de 1:2, formando duas fases, e então centrifugadas por 45 minutos a $1.500 \times g$. O anel contendo as células após a centrifugação foi aspirado com pipeta de bulbo, e sucederam-se lavagens com meio de cultura RPMI completo (Gibco, Auckland, Nova Zelândia). As células foram distribuídas na cultura, resultando em 2×10^5 células/poço. Foram então, estimuladas com o antígeno recombinante Tc14 (0,05; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0 e 10,0 μg / poço) sendo incubadas por 96 horas em estufa de CO_2 , a 37°C . Nas últimas 16 horas foi acrescentado $1\mu\text{Ci}$ de timidina triciada (Amersham Bioscience, Pittsburgh, EUA) à cultura. Como controle positivo foi utilizado o mitógeno fitohemaglutinina a $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Sigma, St. Louis, EUA). Após a incubação, as células foram coletadas em coletor automático de células (cell harvester - Packard Instrument Company, Meriden, EUA), e a radioatividade incorporada foi medida em contador de partículas beta (Micro Beta TriLux - Perkin Elmer, São Paulo, Brasil).

4.2.4.2. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura

Foram utilizados testes comerciais ELISA (BD Biosciences Systems, New Jersey, EUA) para a dosagem de citocinas IL-10 e $\text{IFN-}\gamma$ a partir dos sobrenadantes de cultura celular. Para tanto, foram distribuídas 1×10^6 células/poço em placas de 24 orifícios e estimuladas com 2 e 10 μg do antígeno Tc14 conforme o descrito acima. Após 48 horas de cultura o sobrenadante foi recolhido e analisado conforme procedimento abaixo.

Ambos os testes utilizados para a pesquisa de citocinas empregavam o método de captura, no qual o anticorpo monoclonal anti-citocina está fixado ao suporte. A citocina presente na amostra interage com o anticorpo fixado ao suporte e também com um segundo anticorpo conjugado à biotina. A revelação é realizada após a interação entre avidina-peroxidase e biotina, pela adição de OPD (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA). A determinação da concentração das citocinas deu-se por meio de curva obtida com diferentes concentrações de padrão correspondente.

4.2.4.3. ELISA para isotipagem de IgG em plasma

Placas de fundo plano Costar[®] (High Binding, Corning Incorporated, EUA) foram sensibilizadas com 100 μ L por poço do antígeno recombinante na concentração de 0,3 μ g em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. Seguiu-se incubação por 18 h a 4°C em câmara úmida.

Após incubação, as placas foram lavadas com PBS-T e incubadas em solução de bloqueio por 2 horas a 37°C. Posteriormente, foram adicionadas amostras de plasma a 1:50 em solução diluente e incubadas durante 2 horas a 37°C. Após lavagem das placas, foi adicionado o respectivo conjugado anti-isótipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) humano marcado com peroxidase (Invitrogen, Camarillo, EUA) diluído a 1:500. Após incubação por 1 hora a 37°C foi realizada lavagem e a reação enzimática foi revelada pela adição de 1 mg.mL^{-1} de OPD (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) diluído em tampão fosfato-citrato, pH 4,8 contendo 0,03% (vol/vol) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido sulfúrico 4 N. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (SLT-Spectra, Salzburg, Áustria) a 492 nm.

Foram escolhidas aleatoriamente duas amostras do grupo controle negativo para a realização do cálculo do índice de reatividade, sendo os resultados obtidos expressos da seguinte forma: absorbância da amostra em estudo/ média das absorbâncias das duas amostras do grupo controle negativo.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística aplicada aos resultados foi realizada utilizando-se o **teste Mann-Whitney (GraphPad Prism versão 5.0)**. O nível de significância admitido foi de $p < 0,05$ em todas as amostras analisadas.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

5.1.1. Processos de clonagem

5.1.1.1. Extração de RNAm

Em um total de 200 mg de larvas de *T. crassiceps* foi obtido volume de 30 μ L de RNAm com concentração de 0,65 μ g/ μ L, totalizando 18,7 μ g de RNAm.

5.1.1.2. Amplificação do DNA por PCR

Após obtenção de cDNA a partir do RNAm de *T. crassiceps* (RT-PCR), foi realizada PCR utilizando-se o respectivo cDNA como *template* e *primers* desenhados com base na sequência obtida por ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994). O produto desta reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%, resultando em fragmento de aproximadamente 250 pares de base (indicado pela seta na Fig. 1). A concentração de DNA obtida após a amplificação foi de 50 μ g/ μ L.

Fig. 1. Análise eletroforética do produto de PCR correspondente ao gene Tc14 em gel de agarose 1,5%. Sendo, P: padrão de peso molecular λ HindIII e PCR: fragmento de 250 pares de base (pb) obtido por PCR utilizando-se cDNA de *T. crassiceps* como *template*.

5.1.1.3. Transformação de bactérias DH5 α competentes e extração plasmídeos por lise alcalina

Foram obtidos 24 clones recombinantes a partir da transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5 α . Todos foram expandidos para extração de DNA plasmidial por lise alcalina (Fig. 2). Desses clones, seis (7, 14, 15, 16, 20 e 23) foram selecionados randomicamente para análise por digestão enzimática com *EcoRI* e *HindIII* a fim da verificação da presença do inserto. Após a digestão, foi possível observar inserto de aproximadamente 250 pares de base em todos os clones testados (Fig. 3).

Fig. 2. Análise eletroforética dos plasmídeos recombinantes (vetor de clonagem) não digeridos extraídos por lise alcalina em pequena escala (1 a 24) em gel de agarose 1,0%, obtidos a partir de bactérias *E. coli* DH5 α previamente transformadas. O plasmídeo *pMOSBlue* foi representado por pMOS e P indica o padrão de peso molecular λ *HindIII*.

Fig. 3. Seleção de clones recombinantes (vetor de clonagem) por restrição enzimática com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* e análise em gel de agarose (1,5%). Sendo 1: clone 7, 2: clone 14, 3: clone 15, 4: clone 16, 5: clone 20 e 6: clone 23. Todos os clones apresentaram inserto de 250 pares de base (indicado pela seta). Sendo o plasmídeo vazio *pMOSBlue* representado por pMOS e o padrão de peso molecular λ *HindIII* por P.

5.1.1.4. Sequenciamento do DNA

Foi realizado alinhamento dos resultados obtidos no sequenciamento com a proteína recombinante pTcA5, obtida por ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994). A Fig. 4 representa a análise comparativa das respectivas sequências completas, sendo as caixas cinza representativas das regiões de identidade entre as sequências de aminoácidos das duas proteínas, demonstrando 100% de identidade, confirmando que o produto de PCR amplificado corresponde à pTcA5. Dentre os clones analisados (7, 20 e 23) foi selecionado o clone 7, já que o mesmo foi o único que apresentou *stop códon*.

1	M R A S T F I A L A T L V I T V V A A P T D D K G P E D L K	pTcA5.
1	M R A S I F L A L A I L V I T V V A A P T D D K G P E D L K	Tc 14
31	K K M M K Q L G E V R R F F R E D P L G Q K I I D H F Q E T	pTcA5.
31	K K M M K Q L G E V R R F F R E D P L G Q K I I D H F Q E T	Tc 14
61	V S I C K A I R E R I R K R L G E Y L K G L E N E	pTcA5.
61	V S I C K A I R E R I R K R L G E Y L K G L E N E	Tc 14

Fig. 4. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos clones pTcA5 (acesso U07150) e Tc14 (clone 7), demonstrando 100% de identidade entre as sequências das proteínas analisadas.

5.1.1.5. Subclonagem do inserto em vetor de expressão

Após confirmação da sequência, o inserto foi submetido à clonagem no vetor de expressão pHIS. Os produtos de ligação foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α e o material plasmidial extraído por lise alcalina (Fig. 5). Após a análise de restrição com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* para verificação da presença do inserto (Fig. 6) foram escolhidos randomicamente dois clones para análise de expressão.

Fig. 5. Análise eletroforética (gel de agarose 1,0%) dos plasmídeos recombinantes (vetor de expressão) não digeridos extraídos por lise alcalina de bactérias *E. coli* DH5 α previamente transformadas. Sendo PM: padrão molecular λ *Hind*III, V: vetor pHis sem inseto, (1-12): clones resultantes da extração.

Fig.6. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% da seleção de clones recombinantes (vetor de expressão) por restrição enzimática com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III. Sendo PM: padrão de peso molecular λ *Hind*III; 1: pMosBlue contendo o inserto digerido com *Eco*RI e *Hind*III; 2: vetor pHis digerido com *Eco*RI; 3: vetor pHis digerido com *Hind*III; 4 ao 15: clones obtidos por lise alcalina digeridos com *Eco*RI e *Hind*III.

5.1.2. Expressão da proteína recombinante

5.1.2.1. Escolha do melhor sistema de expressão

Para obtenção de maior rendimento na expressão da proteína recombinante, foram testadas diferentes linhagens bacterianas de *E. coli* (DE3): BL-21, Rosetta-gami, pLys S, Ril e BL21-Rp, nas temperaturas de indução a 30 e 37°C. A análise em gel de

poliacrilamina seguida de coloração por Coomassie *Blue* não foi eficiente para demonstrar a presença da proteína recombinante (14 kDa) no sobrenadante, já que a mesma sofre sobreposição de proteínas bacterianas, conforme podemos observar na Fig. 7. A análise por Imunoblot anti-histidina revelado por quimioluminescência demonstrou que, embora a proteína recombinante tenha sido encontrada no precipitado dos diferentes sistemas de expressão (dado não mostrado), só foi possível encontrá-la de forma solúvel quando utilizado o sistema *E. coli* BL21 tanto a 30°C quanto a 37°C, embora a última temperatura possibilitou maior rendimento (Fig. 8).

Fig. 7. Análise da expressão proteica a partir de diferentes linhagens de bactérias *E. coli* (DE3) em SDS PAGE 15% corado por Coomassie *Blue* das frações solúveis obtidas após indução com IPTG. Sendo 1: pLys S induzida a 30°C, 2: padrão de peso molecular, 3: pLys S não induzida a 30°C, 4: pLys S induzida a 37°C, 5: pLys S não induzida a 37°C, 6: BL21 induzida a 30°C, 7: BL21 não induzida a 30°C, 8: BL21 induzida a 37°C, 9: BL21 não induzida a 37°C, 10: BL21 não induzida a 37°C. A seta indica a posição de 14 kDa.

Fig. 8. Detecção da expressão da proteína recombinante por Imunoblot anti-histidina revelado por quimioluminescência nos sobrenadantes obtidos em diferentes linhagens bacterianas após a indução com IPTG. Os resultados obtidos a temperatura de 30°C estão indicados pela letra A e a 37°C estão indicados pela letra B. Sendo 1: Rosetta-gami não induzida, 2: Rosetta-gami induzida, 3: pLys S não induzida, 4: pLys S induzida, 5: Ril não induzida, 6: Ril induzida, 7: BL21 não induzida, 8: BL21 induzida, 9: BL21-Rp não induzida e 10: BL21-Rp induzida. As bandas obtidas apresentaram peso molecular de 14kDa (indicadas pela seta), correspondentes a proteína recombinante Tc14 obtida em sobrenadante de *E. coli* (DE3) BL21 tanto a 30 quanto a 37°C.

5.1.2.2. Otimização da quantidade de IPTG para melhor indução

Para obtenção da condição de indução que possibilitasse melhor rendimento, foi realizada em pequena escala a indução de *E. coli* (DE3) BL-21 a 37°C frente a diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mM). Após indução, seguiu-se a análise através de Imunoblot anti-histidina, resultando em maior quantidade de proteína solúvel a 0,4 mM de IPTG. Foi observada reatividade no precipitado de todas as concentrações de IPTG testadas, com exceção de 0,6 mM (Fig. 9).

Fig. 9. Otimização da expressão da proteína recombinante a partir de *E. coli* BL21 após indução com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mM). Os precipitados e sobrenadantes obtidos foram analisados através de Imunoblot anti-histidina revelado por quimioluminescência. Os sobrenadantes revelados estão representados de acordo com a concentração de IPTG utilizada na indução em: 1 (0,1 mM), 2 (0,2 mM), 3 (0,4 mM), 4 (0,6 mM), 5 (0,8 mM), 6 (1,0 mM), além do clone não induzido (NI). Os precipitados analisados seguem o mesmo padrão de representação, sendo: 7 (0,1 mM), 8 (0,2mM), 9 (0,4 mM), 10 (0,6 mM), 11 (0,8 mM), 12 (1,0 mM) e clone não induzido (NI). A seta indica a posição de 14 kDa.

5.1.2.3. Purificação da proteína recombinante

5.1.2.3.a. Purificação em resina de níquel

O sobrenadante obtido após indução com 0,4 mM de IPTG a 37°C foi aplicado em resina de níquel e submetido à purificação com aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol (0; 15; 30; 50; 80; 100; 150; 200; 250 e 400 mM). A proteína foi obtida com maior pureza nas concentrações de 250 e 400 mM de imidazol (Fig. 10), a proteína eluída a 400 mM utilizada em imunoenaios após diálise em tampão PBS. A confirmação da presença da proteína deu-se através de Imunoblot anti-histidina (Fig. 11).

Fig. 10. Análise em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie *Blue* da proteína recombinante Tc14 purificada por cromatografia de afinidade com aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol. Sendo PM: padrão de peso molecular, 1: 0 mM de imidazol, 2: 30 mM de imidazol, 3: 50 mM de imidazol, 4: 80 mM de imidazol, 5: 100 mM de imidazol, 6: 150 mM de imidazol, 7: 200 mM de imidazol, 8: 250 mM de imidazol, 9: 400 mM de imidazol. A proteína foi obtida nas eluições a 250 e 400 mM de imidazol. A seta indica a posição de 14 kDa.

Fig. 11. Análise das etapas de purificação da proteína recombinante Tc14 por Imunoblot após eluição com aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol. Estão representadas as eluições obtidas com 250 (1) e 400 mM (2) de imidazol.

5.1.2.3.b. Purificação em resina de cobalto

Foi realizada também purificação utilizando-se resina de cobalto com aumento gradativo não contínuo da concentração de imidazol (0; 15; 30; 50; 80; 100; 150; 200; 250 e 400 mM). A análise em gel de poliacrilamida a 15% não permitiu a visualização de bandas correspondentes à proteína recombinante. O Imunoblot anti-histidina de todas as frações utilizadas na purificação resultou no aparecimento da proteína recombinante (indicada pela seta, Fig.12) em 0 mM e 15mM de imidazol, demonstrando que este método não foi efetivo para a purificação da proteína.

Fig. 12. Imunoblot anti-histidina das frações obtidas após purificação em resina de cobalto eluindo-se com imidazol. As concentrações de 0 mM de imidazol (1, 2 e 3); 15 mM (4, 5, 6 e 7) e 30 mM (8 e 9) estão representadas. A partir de 30 mM não foi observada reatividade. A seta indica a posição de 14 kDa.

5.1.2.4. Dosagem do antígeno recombinante Tc14

A partir de 1 litro de expressão foram obtidos aproximadamente 5 mL contendo $453 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da proteína recombinante eluída a 400 mM de imidazol após diálise em PBS.

5.1.3. Avaliação da proteína recombinante em imunensaio

5.1.3.1. Caracterização do antígeno recombinante frente a anticorpos monoclonais

A fim de verificarmos se a proteína Tc14 de fato compartilhava epítomos com os antígenos de líquido vesicular de *T. crassiceps*, foi realizado Imunoblot da referida proteína frente a diferentes anticorpos monoclonais (AcMo). A análise de reconhecimento do antígeno recombinante Tc14 se deu através da verificação da reatividade com: AcMo anti-antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*, AcMo anti-líquido vesicular de *T. crassiceps*, AcMo anti-líquido vesicular de *T. solium*, AcMo anti-antígeno total de *T. solium* e AcMo anti-antígeno de escólex de *T. solium* (Fig. 13), obtidos por ESPÍNDOLA *et al.* (2000). Houve reconhecimento de frações de 14 kDa com todos os AcMo, exceto o AcMo anti-antígeno de escólex de *T. solium*.

Fig. 13. Imunoblot revelado por colorimetria (4-cloro- α -naftol) da reatividade encontrada com o antígeno recombinante Tc14 frente a diferentes AcMo. Sendo ES (AcMo anti-antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*), LV (AcMo anti-líquido vesicular de *T. crassiceps*), LT (AcMo anti-líquido vesicular de *T. solium*), T (AcMo anti-antígeno total de *T. solium*) e E (AcMo anti-antígeno de escólex de *T. solium*).

5.1.3.2. Perfil de reatividade da proteína recombinante por Imunoblot utilizando amostras de soro e LCR

Todas as amostras de soro (22 amostras) e LCR (19 amostras) dos pacientes com NC utilizadas apresentaram reatividade com a proteína Tc14, verificada pela presença de banda na altura de 14 kDa (Fig. 14). Não houve reatividade com as amostras do grupo controle negativo para soro (48 amostras) e LCR (28 amostras), além do grupo outras parasitoses (17 amostras de hidatidose). Não foi possível realizar Imunoblot das amostras de hidatidose e estrongiloidíase reativas no ELISA (Fig. 17, item 5.1.3.3.c) devido a volume insuficiente das mesmas.

Fig. 14. Imunoblot demonstrando o perfil de reatividade com o Ag Tc14 frente a: 19 amostras de LCR de pacientes com NC, 28 amostras de LCR de indivíduos controle negativo, 22 amostras de soro de pacientes com NC, 17 amostras de soro de indivíduos com outras parasitoses, 48 amostras de soro de indivíduos controle negativo. Sendo C+ constituído por pool de amostras de soro de pacientes com NC. As setas indicam a posição de 14kDa.

5.1.3.3. Padronização de ELISA

5.1.3.3.a. Utilizando amostras de LCR

Os resultados da padronização do ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando o antígeno recombinante Tc14 em diferentes concentrações (0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 e 0,0125 µg/poço) associadas ao conjugado diluído a 1:2000 (Fig. 15-A) e 1:3000 (Fig. 15-B) frente a pool de 5 amostras de LCR de pacientes com NC (C+) e pool de 5 amostras do grupo controle negativo (C-) diluídas a 1:50, 1:100 e 1:200 estão representados na Fig. 15. Os resultados obtidos utilizando-se o conjugado a 1:4000 não permitiram diferenciação apreciável entre os grupos avaliados, dessa forma, não foram representados graficamente.

Permitiram melhor diferenciação entre os grupos NC e controle negativo as seguintes condições: antígeno para sensibilização da placa a 0,5 µg/poço, amostras diluídas a 1:50 e conjugado diluído a 1:2000, sendo a solução de bloqueio e o diluente das amostras leite 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20.

A- ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando conjugado a 1:2000

B- ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando conjugado a 1:3000

Fig. 15. Representação gráfica das absorbâncias obtidas em ELISA para pesquisa de IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando-se pool de LCR de pacientes com neurocisticercose (NC) e pool do grupo controle negativo (C-) para diferentes concentrações de Ag recombinante Tc14 (curva partindo de 0,5 até 0,0125 µg/poço), utilizando diferentes diluições de conjugado (A- 1:2000 e B-1:3000) e amostras diluídas a 1:50, 1:100 e 1:200. As respectivas concentrações de antígeno encontram-se entre parênteses no eixo x.

5.1.3.3.b. Utilizando amostras de soro

Na análise para o estabelecimento das melhores condições para o ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* em soro foram avaliadas diferentes concentrações do antígeno recombinante Tc14 (0,5; 0,3; 0,15 e 0,05 µg/poço), diluições distintas do conjugado (1:1000 –Fig. 16A e 1:2000 – Fig. 16B) e 3 amostras diluídas a 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400 tanto para o grupo NC (C+) quanto para o grupo controle negativo (C-). Os resultados obtidos utilizando-se o conjugado a 1:3000 não foram expressos graficamente, devido ao fato de não possibilitarem diferenciação entre os grupos. A média das absorbâncias obtidas nas diferentes condições foi expressa graficamente (Fig. 16). A melhor diferenciação entre as absorbâncias obtidas nas amostras do grupo NC e controle negativo deu-se nas seguintes condições: concentração de antígeno para sensibilização da placa a 0,3 µg/poço, amostras diluídas a 1:100 e conjugado diluído a 1:1000, sendo a solução utilizada para bloqueio e diluente das amostras leite a 5% em PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20. A diluição das amostras a 1:400 não foi representada graficamente, já que a mesma impossibilitou diferenciação entre os grupos NC e controle.

A- ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando conjugado a 1:1000

B- ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando conjugado a 1:2000

Fig. 16. Representação gráfica da média das absorbâncias obtidas utilizando três amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (NC) e três amostras do grupo controle (C-) para diferentes concentrações de Ag recombinante Tc14 (0,5; 0,3; 0,15 e 0,05 µg/poço) no ELISA para pesquisa de IgG anti-cisticerco de *T. solium*, utilizando diferentes diluições de conjugado (A-1: 1000 e B-1: 2000) e amostras diluídas a 1:50, 1:100 e 1:200. As respectivas concentrações de antígeno encontram-se entre parênteses no eixo x.

5.1.3.3.c. Reatividade em ELISA para a pesquisa de anticorpos IgG anti-antígenos de cisticerco de *T. solium* nos grupos controle positivo (NC), controle negativo e outras parasitoses

Para a análise do LCR, a definição do *cut off* deu-se pela média dos índices de reatividade (absorbância da amostra/absorbância de amostra controle) obtidos no grupo controle negativo adicionadas de três desvios padrões. Resultando em *cut off* de 1,16, que permitiu a obtenção de 100% de sensibilidade e especificidade (Fig. 17).

Para melhor estudo do desempenho do ELISA realizado para soro, diferentes valores de *cut off* foram calculados (Fig. 17), sendo seus respectivos índices de positividade apresentados na Tabela 1. O *cut off a* (1,53) foi estipulado a fim de que fosse obtida a maior especificidade possível, diferentemente do *cut off c* (0,75) que buscou maior sensibilidade. Já o *cut off b* (1,12) foi calculado de forma semelhante ao do LCR, ou seja, através da média dos índices de reatividade obtidos nas amostras do grupo controle, acrescida de três desvios padrões.

Fig. 17. Representação gráfica dos índices de reatividade obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando antígeno recombinante Tc14 a 0,5 µg/poço para LCR e 0,3 µg/poço para soro. Para o ensaio com LCR foram utilizadas 29 amostras de pacientes com NC (NC) e 35 amostras do grupo controle negativo (GCN), enquanto que para a análise dos soros foram utilizadas 41 amostras de paciente com NC (NC), 52 amostras do grupo controle negativo (GCN) e 51 amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (OP). Houve diferença estatística significativa (***) entre as amostras de pacientes com NC e grupo controle negativo tanto para LCR quanto para soro, bem como entre as amostras de soro do grupo controle positivo (NC) e outras parasitoses (OP) ($p < 0,0001$, teste Mann-Withney). Os valores estabelecidos para os diferentes *cut off* foram de: 1,53 (a), 1,12 (b) e 0,75 (c) para soro e 1,16 para LCR.

Tabela 1. Positividade do teste ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose (NC), grupo controle negativo (GCN) e outras parasitoses (OP) utilizando diferentes *cut offs*.

AMOSTRAS	N	<i>cut off</i>		
		1,53 (a)	1,12 (b)	0,75 (c)
NC	41	78% (65,4 – 90,6%)	95,1% (88,5 - 100%)	100% (97,5 - 100%)
GCN	52	0% (0,0 - 3,7%)	0% (0,0 – 3,7%)	15,4% (5,6 - 25,2%)
OP	51	0% (0,0 - 3,7%)	3,9% (0,0 - 30,8%)	15,6% (5,7 - 25,5%)

Dados em negrito representam a porcentagem de positividade que possibilitaram melhor diferenciação das amostras de soros utilizadas no ensaio.

O intervalo de confiança (95%) foi representado entre parêntesis.

Os índices de positividade demonstrados na tabela acima indicam que para o *cut off b* (1,12), tem-se sensibilidade de 95,1% e especificidade de 100%, havendo reatividade cruzada com duas amostras: um soro de hidatidose e outro de estrogiloidíase. O *cut off a* (1,53), calculado a fim de se obter máxima especificidade (100%), apresentou sensibilidade de 78%; não houve reatividade cruzada com o grupo outras parasitoses. Já o *cut off c* (0,75), calculado objetivando a máxima sensibilidade (100%), apresentou índice de especificidade de 84,6% e reatividade cruzada com uma amostra de amebíase, duas de estrogiloidíase, duas de teníase e duas de hidatidose do grupo outras parasitoses

5.1.3.4. Comparação entre testes sorológicos utilizando diferentes antígenos em amostras de pacientes com NC

Foram realizados diferentes testes sorológicos (ELISA e Imunoblot) com antígenos distintos oriundos de *T. crassiceps* (antígeno de líquido vesicular, de excreção e secreção, purificado e recombinante) e de *T. solium* (antígeno total e purificado) a fim de avaliarmos o comportamento sorológico de 12 amostras de soro de

pacientes com NC. Os resultados dos índices de positividade encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de positividade obtida utilizando-se 12 amostras de soro de pacientes com neurocisticercose em diferentes imunoensaios para detecção de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium*. Os testes analisados foram: ELISA 18/14 (antígeno 18/14 de *T. crassiceps*), ELISA Tc14 (antígeno recombinante Tc14), Imunobot (IB) IBTso (antígeno total de *T. solium*), IBLLGP (glicoproteínas de *T. solium* purificadas em coluna de lectinas), IBLVTcra (antígeno do líquido vesicular de *T. crassiceps*), IBES (antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*) e o IBTc14 (antígeno recombinante Tc14).

Imunoensaio	Reagentes/n	Porcentagem de positividade
ELISA Tc14	10/12	83,4%
ELISA 18/14	11/12	91,6%
IB Tc14	12/12	100%
IBLVTcra	9/12	75%
IBES	8/12	66,7%
IBLLGP	12/12	100%
IBTso	10/12	83,4%

Os imunoensaios em negrito representam os ensaios utilizando o antígeno recombinante.

Pode ser observado que o Imunoblot Tc14 apresentou reatividade para todas as amostras estudadas, demonstrando a mesma porcentagem de positividade que o IBLLGP (TSANG, BRAND & BOYER, 1989). Por outro lado, a análise por ELISA apresentou uma amostra próxima ao *cut off*, considerada não reagente para Tc14 e reagente para o antígeno 18/14.

5.1.4. Imunoestimulação promovida pelo antígeno recombinante Tc14 *in vitro* e dosagem de citocinas

5.1.4.1. Linfoproliferação

Células mononucleares de 10 pacientes com NC e 11 indivíduos do grupo controle negativo (GCN) foram estimuladas com diferentes concentrações antigênicas de Tc14 (0,05; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0 e 10,0 µg/poço). Os dados clínicos relevantes dos

pacientes com NC e as concentrações antigênicas de Tc14 capazes de induzir a linfoproliferação das respectivas células estão representadas na Tabela 3.

Após leitura da incorporação de timidina triciada, foram calculados os índices de estimulação [média cpm (contagem por minuto da amostra) /média cpm do controle negativo da amostra]. De acordo BUENO *et al.* (2001) foram considerados positivos os índices de estimulação acima de 2,5. Dessa forma, diferentemente das outras concentrações antigênicas, não foi observada linfoproliferação detectável com células de pacientes com NC quando estimuladas a 10,0 µg/ poço. Nenhum estímulo com Tc14 foi capaz de induzir proliferação no grupo controle negativo (Fig. 18), embora todas as amostras deste grupo bem como do NC responderam ao estímulo com fitohemaglutinina.

A Figura 19 representa a porcentagem de positividade encontrada no grupo NC frente às diferentes concentrações antigênicas de Tc14. De forma que o estímulo de 0,4 µg/poço apresentou 50,0% de indivíduos respondedores, já para as outras concentrações utilizadas a porcentagem de positividade foi de 16,6% para os estímulos de 0,05 e 0,6 µg/ poço, 44,4% a 1,0 µg/ poço e 20% a 2,0 µg/ poço.

Tabela 3. Dados clínicos de 10 pacientes com NC e concentrações antigênicas de Tc14 ($\mu\text{g/poço}$) nas quais foi possível observar linfoproliferação, considerando-se índice de estimulação (cpm da amostra/cpm do meio contendo células) acima de 2,5 positivo. Sendo o sexo representado por M (masculino) e F (feminino) e a ausência de linfoproliferação por AL.

Idade (anos)	Sexo	Localização do cisticerco	Estágio do cisticerco	Linfoproliferação ($\mu\text{g/poço}$) *
69	M	Lobo temporal, lobo frontal, região dos núcleos da base, occipitais e temporais	Cistos em degeneração com processo inflamatório e cistos íntegros	AL
36	F	Parênquima de ambos os hemisférios cerebrais	Múltiplos cistos íntegros e calcificações dispersas	AL
27	M	Parênquima cortical, subcortical e núcleos da base bilateral	Múltiplas calcificações	0,05; 0,4; 0,6 e 1,0
21	M	Lesão nodular cortical no giro frontal superior a direita	Cistos calcificados com leve processo inflamatório residual	0,4 e 1,0
34	F	Múltiplas lesões distribuídas na transição cortico-subcortical dos hemisférios cerebrais, no espaço subaracnóide frontal polar esquerdo e paramediano direito	Múltiplas lesões císticas, algumas com conteúdo espesso e discreto edema periférico; presença de calcificações dispersas	AL
63	M	Cistos em ambos os hemisférios cerebrais	Lesão cística com realce anular e edema compatível com lesão granulomatosa parasitária	AL
31	M	Região frontal basal, temporal e parietal esquerdas	Lesão cística com leve edema periférico; presença de calcificações	1,0 e 2,0
71	F	Calcificações esparsas pelos hemisférios cerebrais Cisto íntegro junto ao Vale Sylviano direito	Calcificações puntiformes e cisto íntegro	0,4, 1,0 e 2,0
58	M	Occipital, frontal e temporal	Presença de calcificações, cistos íntegros e cisto em degeneração.	AL
31	F	Região frontal superior, lobo parietal superior, lobo occipital à direita e região periopercular esquerda	Múltiplos cistos íntegros, sem sinais inflamatórios	AL

*Estão representadas somente as concentrações antigênicas indutoras de linfoproliferação

AL: Ausência de Linfoproliferação

Fig. 18. Representação gráfica dos índices de estimulação (cpm amostra/ cpm meio com células) obtidos após estímulo com Tc14 em diferentes concentrações (0,05; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0 e 10,0 µg/poço) utilizando-se células provenientes de 10 indivíduos com neurocisticercose (NC) e de 11 indivíduos saudáveis para a patologia em questão (GCN). A média e desvio padrão estão representados para cada grupo nos diferentes estímulos. Houve diferença estatística significativa entre os grupos GCN e NC quando utilizado 0,4 µg Tc14/poço ($p=0,0411$, teste Mann-Whitney).

Fig. 19. Representação gráfica da porcentagem de indivíduos respondedores baseada na proliferação de células mononucleares de 10 indivíduos com NC frente a estímulo antigênico com Tc14 em diferentes concentrações (0,05; 0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 10,0 µg/poço).

5.1.4.2. Dosagem de Citocinas

Foram dosadas as citocinas IFN- γ e IL-10 por ELISA em sobrenadante de culturas celulares 48 horas após estímulo com a proteína recombinante Tc14 a 2 e 10 $\mu\text{g/poço}$. Ambos os kits apresentaram curva padrão satisfatória com o índice de correlação linear (r^2) de 0,9967 e 0,9996 respectivamente para IFN- γ e IL-10. Não houve reatividade das amostras ensaiadas para a citocina IFN- γ em nenhuma das concentrações antigênicas utilizadas, enquanto que foi possível detectar reatividade diferenciada ($p=0,0053$, teste Mann-Whitney) entre o grupo controle negativo (GCN) e o grupo de pacientes com neurocisticercose (NC) para IL-10 estimulando-se as células com 2 μg de Ag Tc14/poço (Fig. 20). Somente uma amostra do GCN apresentou a citocina IL-10 detectável, quantificada em 254 pg.mL^{-1} , enquanto que duas amostras do grupo NC não apresentaram reatividade no ensaio, nem diferença expressiva na linfoproliferação em relação as amostras controle.

Fig. 20. Representação gráfica da quantificação da citocina IL-10 em pg.mL^{-1} obtida a partir de ELISA de captura em sobrenadante de cultura coletado 48 horas após estímulo com 2 $\mu\text{g/poço}$ de Tc14. Foram utilizadas 11 amostras provenientes de cultura celular de pacientes com neurocisticercose (NC) e 11 amostras provenientes de indivíduos saudáveis (GC). Houve diferença estatística significativa entre as amostras controle positivo (NC) e negativo (GC), $p=0,0053$ (teste Mann-Whitney).

5.1.4.3. Verificação da reatividade de IgG total e isótipos em plasma frente ao antígeno recombinante Tc14 por ELISA

Das amostras utilizadas para ensaios de linfoproliferação e dosagem de citocinas foram fracionados os plasmas e utilizados em ELISA para pesquisa de IgG anti-cisticerco de *T. solium* seguindo as mesmas condições estabelecidas para soro (Fig. 16, item 5.1.3.3.b), utilizamos 12 amostras de plasma, sendo que duas destas não possuem dados de linfoproliferação, devido a quantidade insuficiente de células, porém uma amostra possuía células suficientes para a realização da dosagem de citocinas. Das 12 amostras do grupo NC ensaiadas, onze (91,67%) mostraram-se reativas em relação aos plasmas do grupo controle negativo (GCN), enquanto que uma amostra encontrou-se 10% abaixo do limiar de reatividade (zona cinza). O cálculo do *cut off* (1,86) deu-se através da média dos índices de reatividade obtidos no grupo controle negativo acrescida de três desvios padrões, sendo os índices de reatividade obtidos representados na Figura 21.

Fig. 21. Representação gráfica dos índices de reatividade obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando antígeno recombinante Tc14 frente a 12 amostras de plasma de pacientes com NC e 11 amostras do grupo controle negativo (GCN). Houve diferença estatística significativa entre as amostras controle positivo e negativo, sendo $p < 0,0001$ (teste Mann-Whitney).

Após a análise de IgG total, os plasmas foram ensaiados por ELISA utilizando o antígeno Tc14 para dosagem dos isótipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Foi encontrada reatividade de 75% (9 amostras) para IgG1, 33,3% (4 amostras) para IgG2, 50% (6 amostras) para IgG3 e 25% (3 amostras) para IgG4 (Fig. 22). A análise individual da reatividade obtida para os diferentes isótipos encontra-se representada na Tabela 4. Não houve reatividade nos plasmas do grupo controle negativo.

Dentre os plasmas analisados, seis apresentaram isótipos que sugerem predominância Th1 (IgG1 e IgG3), enquanto que 5 apresentaram padrão misto e um apresentou isótipo que sugere predominância Th2 (IgG4).

Fig. 22. Porcentagem de positividade obtida em ELISA para pesquisa de isótipos de IgG anti-cisticerco de *T. solium* utilizando o antígeno Tc14 e 12 plasmas de indivíduos acometidos pela neurocisticercose.

Tabela 4. Perfil de reatividade de 12 plasmas de indivíduos acometidos pela neurocisticercose em ELISA utilizando-se Tc14 para determinação de isótipos de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). A presença de reatividade foi representada por **R** e a ausência de reatividade por NR. Sendo n, o número total de amostras ensaiadas.

IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Amostras reagentes/ n
R	NR	NR	NR	2/12
NR	NR	R	NR	1/12
NR	NR	NR	R	1/12
R	NR	R	NR	3/12
R	NR	NR	R	1/12
R	R	NR	R	1/12
R	R	R	NR	1/12
R	R	NR	NR	1/12
NR	R	R	NR	1/12

6. DISCUSSÃO

A padronização de testes imunológicos alternativos para o diagnóstico da cisticercose é de suma importância, visto que a presença de doenças parasitárias constitui o maior problema de saúde pública do mundo, não apenas pela mortalidade e morbidade envolvidas, mas também pelos fatores de riscos crescentes associados com a transmissão (NOYA *et al.*, 2003, PRASAD *et al.*, 2008).

Nossa equipe, ao longo dos anos, vem trabalhando no desenvolvimento do diagnóstico laboratorial da NC com base em antígenos brutos e purificados de *T. crassiceps* (BUENO *et al.*, 2000; ESPINDOLA *et al.*, 2005). Como vantagens em relação à utilização de cisticercos de *T. solium* tem-se que as larvas podem ser facilmente mantidas em peritônio de camundongos (VAZ *et al.*, 1997), porém, a complexidade, o alto custo e a tecnologia envolvida no processo de purificação dos antígenos a fim de obter frações proteicas específicas, ainda constituem dificuldades em sua obtenção (ESPINDOLA *et al.*, 2005), tornando a utilização de antígenos recombinantes, um importante alvo de estudo.

6.1. ANTÍGENO RECOMBINANTE

Diversos antígenos recombinantes vêm sendo desenvolvidos com base em sequências de *T. solium* (CHUNG *et al.*, 1999; GAUCI *et al.*, 1998; GREEN *et al.*, 2000; HANCOCK *et al.*, 2004, 2007; HUBERT *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2001; KALINNA & McMANUS, 1996; LEE *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2006; MAYTA *et al.*, 2007; MONTERO *et al.*, 2003; PARKHOUSE *et al.*, 2008; SAKO & ITO, 2001; SAKO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006), *T. saginata* (FERRER *et al.*, 2007a) e *T. crassiceps* (FISCHER *et al.*, 1994; GEVORKIAN *et al.*, 1996; MANOUTCHARIAN *et al.*, 1996; ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN, 1994) a fim de se obter proteínas promissoras para imunoensaios e até mesmo para vacinação (HERNANDEZ *et al.*, 2007).

Nesse trabalho foi produzida proteína recombinante a partir de RNAm de *T. crassiceps* (Fig. 1, 2 e 3) e avaliada sua posterior utilização em imunoensaios para detecção de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* em pacientes com NC.

A sequência de cDNA aqui obtida apresentou 100% identidade com a utilizada para o desenho dos *primers* (Fig. 4), denominada pTcA5 por ZARLENGA, RHOADS & ALYAMAN (1994). Diferentemente dos autores em questão, que utilizaram o vetor PR987, originando a proteína fusionada a maltose, optamos por utilizar o vetor de expressão pHIS [pET-22b paralelo I modificado por SHEFFIELD *et al.* (1999)] (Fig. 5 e 6) que propicia a obtenção da proteína recombinante fusionada a histidina na região N-terminal (Fig. 10 e 11), devido aos sistemas de purificação disponíveis. LI (2010) ressalta como vantagem da utilização da cauda de histidina o fato de que seu pequeno tamanho (6 a 12 histidinas) diminui a probabilidade de interferência com a estrutura e/ou atividade da proteína recombinante a ser produzida, além de apresentar baixa suscetibilidade frente a condições desnaturantes, que às vezes fazem-se necessárias para a extração/purificação das proteínas geradas.

O sistema de expressão de escolha em nosso trabalho foi a *E. coli* (DE3) BL-21. Vale ressaltar que esta bactéria é amplamente utilizada atualmente para obtenção de antígenos recombinantes (JANA & DEB, 2005; KANE, 1995), sendo que aproximadamente 80% das proteínas recombinantes submetidas ao *protein data bank* em 2003 foram obtidas neste microrganismo (SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Dentre as vantagens desse sistema de expressão podemos citar: baixo custo de manutenção das culturas, conhecimento amplo dos mecanismos genéticos envolvidos e fácil manipulação dessas bactérias (TERPE, 2006; SAHDEV, KHATTAR & SAINI, 2008; SORENSEN & MORTENSEN, 2005). Algumas linhagens de *E. coli* foram testadas em nosso trabalho (Fig. 7 e 8) para a obtenção de maior quantidade de proteína recombinante solúvel possível, sendo que a cepa de escolha [*E. coli* (DE3) BL-21] apresenta deficiência na produção de proteases (CHART *et al.*, 2000). Após o estabelecimento do sistema de expressão (Fig. 8) e de condições adequadas de indução (Fig. 9), procedeu-se a expressão e purificação da proteína recombinante (Fig. 10), além da utilização de Imunoblot anti-histidina para confirmação da presença da proteína recombinante (Fig. 11), em concordância com WALDO *et al.* (1999), que ressaltaram que a presença da cauda de histidina pode auxiliar não somente no momento da purificação, mas também como um marcador de expressão da proteína.

É sabido que proteínas fusionadas à histidina podem ser purificadas em cromatografia de afinidade com metal imobilizado como níquel e cobalto (SAHDEV, KHATTAR & SAINI, 2008). A proteína recombinante obtida neste estudo demonstrou alta afinidade pelo níquel, sendo eluída com maior pureza nas concentrações de 250 e 400 mM de imidazol (Fig. 10), enquanto que sua afinidade pelo cobalto mostrou-se menor, já que a proteína foi obtida a partir de eluição com 0 a 30 mM de imidazol (Fig. 12). Em concordância com nossos resultados, tanto ARAUJO (2008) quanto CROWE *et al.* (1999) relataram superioridade em pureza na purificação de antígeno recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel quando comparada à mesma metodologia utilizando cobalto. Outro aspecto relevante na comparação da utilização das duas resinas, advém do fato de que as que contém níquel são capazes de melhor suportar condições redutoras, como a adição de 2-mercaptoetanol até 20 mM e utilização de ditioneitol. (LI, 2010).

Vale ressaltar que HANCOCK *et al.* (2008) afirmaram que, de forma geral, a purificação de proteínas recombinantes segue procedimentos mais simples em relação aos processos de purificação de extratos brutos, sendo uma vantagem a ser considerada para produção desses antígenos para imunoenaios.

6.2. ANTIGENICIDADE DO ANTÍGENO RECOMBINANTE

6.2.1. Frente aos anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais vêm se mostrando como importantes ferramentas na NC tanto para a purificação de extratos parasitários (ESPÍNDOLA *et al.*, 2005; PERALTA *et al.*, 2010), quanto para detecção de antígenos de cisticerco de *T. solium* em LCR de pacientes acometidos por essa patologia (ESPÍNDOLA *et al.*, 2002), bem como para caracterização antigênica (ZURABIAN *et al.*, 2005).

A reatividade dos AcMo anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* com o antígeno 18/14, demonstrada anteriormente por nossa equipe, e a confirmação da presença destas proteínas nos antígenos de líquido vesicular de *T. crassiceps* (LVTcra) e excreção e secreção de *T. crassiceps* (ES), tornam o estudo da antigenicidade da proteína

recombinante Tc14 com AcMo, uma etapa importante, visando a comparação do mesmo com o antígeno purificado 18/14, que foi considerado como referência de antigenicidade e especificidade para o diagnóstico da NC (ESPINDOLA *et al.*, 2002, 2005).

A análise do antígeno recombinante frente aos AcMo anti-antígeno de excreção e secreção de *T. crassiceps*, AcMo anti-líquido vesicular de *T. crassiceps*, AcMo anti-líquido vesicular de *T. solium* e AcMo anti-antígeno total de *T. solium* demonstrou reconhecimento da fração de 14 kDa, correspondente ao antígeno Tc14. Apenas o AcMo anti-antígeno de escólex de *T. solium* não demonstrou reatividade (Fig. 13). Dessa forma, verificou-se a presença de sequências comuns de aminoácidos entre o antígeno Tc14 e os antígenos de LVTcra e ES. Soma-se a isso, o fato de que ESPINDOLA *et al.* (2000) relataram reatividade desses anticorpos monoclonais exclusivamente com as proteínas de 14-12 kDa em Imunoblot com extrato total de *T. solium*.

A ausência de reatividade do antígeno recombinante com o AcMo anti-escólex de *T. solium* corrobora com o relatado acima, já que esse antígeno possui comportamento sorológico diferenciado dos de baixo peso molecular (NETO *et al.*, 2007; SHUKLA *et al.*, 2008).

6.2.2. Imunoblot

O método imunológico de escolha para o diagnóstico da NC é o Imunoblot desenvolvido por TSANG, BRAND & BOYER (1989) a partir de antígenos de cisticercos de *T. solium* purificados em coluna com lentil-lectinas, que apresentou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade para pacientes com dois ou mais cistos. Uma das desvantagens desse método é decorrente da necessidade dos parasitas e, portanto, de animais infectados, além de apresentar alto custo para sua obtenção e baixo rendimento (SILVA *et al.*, 2006). Dessa forma, a descoberta de antígeno recombinante capaz de reproduzir ou, eventualmente, melhorar as condições de sensibilidade, mantendo a especificidade deste e de outros modelos de testes imunológicos é de grande importância, não só para evitar a utilização de animais, mas também para

possibilitar o acesso do imunodiagnóstico a regiões economicamente menos favorecidas.

Em contraste com SATO *et al.* (2006) que encontraram 6% de falsos negativos utilizando amostras de soro em Imunoblot com os antígenos recombinantes Ag1V1/Ag2, todas as amostras de soro (totalizando 22) e de LCR (19 amostras) provenientes de pacientes com NC submetidas a Imunoblot em nosso estudo demonstraram reatividade na região de 14 kDa, correspondente ao antígeno Tc14 (Fig. 14), incluindo as duas amostras de pacientes com neurocisticercose não reagentes no ELISA (Fig. 17, *cut off* b). Em concordância com nossos resultados CHUNG *et al.* (1999) também obtiveram amostras que se mostraram reativas em Imunoblot e não reativas em ELISA com a proteína recombinante TsM gerada em sistema procarioto. Alguns autores sugerem que a falta de glicosilação pode contribuir para menor interação antígeno-anticorpo no ELISA (CHUNG *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2005). Outra explicação para este fato pode estar relacionada à forma como o antígeno se liga as diferentes matrizes dos testes (placa de poliestireno no ELISA e membrana de nitrocelulose no Imunoblot), somada às condições redutoras de preparo da amostra no Imunoblot, podendo expor diferentes epítomos, e gerar, dessa forma, reatividades diferenciadas entre os dois testes (BUENO *et al.*, 2005).

HANCOCK *et al.* (2004) relataram sensibilidade de 90% e especificidade de 100% em Imunoblot utilizando o recombinante rGP50. Em concordância com o encontrado por estes autores, a proteína Tc14 não apresentou reatividade com as amostras de LCR (totalizando 28) e de soro (48 amostras) provenientes do grupo controle negativo, bem como as do grupo outras parasitoses (17 amostras de hidatidose) (Fig. 14). Porém, as amostras de hidatidose e estrongiloidíase reativas em ELISA (Fig. 17, *cut off* b) não foram ensaiadas devido ao volume insuficiente das mesmas.

6.2.3. ELISA

As fases evolutivas da NC são variáveis e fundamentalmente dependentes de fatores como número e localização do cisticerco e estágio de evolução da infecção

(VAZ & LIVRAMENTO, 1996). A variação clínica encontrada em pacientes com NC deve-se a resposta imunológica, que é imprevisível e individual, partindo de uma completa tolerância a uma intensa resposta (CARPIO, ESCOBAR & HAUSER, 1998).

Além da variação biológica encontrada entre os pacientes, existe a dificuldade no estabelecimento dos parâmetros sorológicos dos testes imunológicos para NC, devido principalmente, a reatividade cruzada entre os antígenos do cisticerco e anticorpos no soro de pacientes com teníase ou hidatidose (EV *et al.*, 1999). Dessa forma, foram realizados ensaios de padronização do ELISA utilizando o antígeno recombinante (Fig.15 e Fig. 16) para a obtenção das melhores condições de realização do teste para detecção de anticorpos anti-antígeno de cisticerco de *T. solium* em soro e LCR de indivíduos acometidos pela NC.

O ELISA com a proteína Tc14 utilizando amostras de LCR (totalizando 29) de pacientes com NC e amostras do grupo controle negativo (35 amostras) demonstrou sensibilidade e especificidade de 100%, enquanto que para soro, utilizando-se 41 amostras de NC e 52 do GCN, a sensibilidade foi de 95,1% e a especificidade de 100% (Fig. 17 e Tabela 1). Em concordância com SILVA *et al.* (2006), a ausência de modificações pós-transducionais devido à obtenção da proteína recombinante em modelo procarioto, não comprometeram de forma expressiva a antigenicidade da proteína obtida. Em contraste com nossos resultados, alguns autores relataram baixa antigenicidade com antígenos não glicosilados (OBREGON-HENAO *et al.*, 2001), enquanto que outros atribuíram resultados falso positivos justamente à glicosilação (HANCOCK *et al.*, 2008). Somado a isso FERRER *et al.* (2007b) encontraram menor *background* em ELISA utilizando antígeno recombinante de *T. saginata* obtido em sistema procarioto em relação ao mesmo antígeno obtido em sistema eucarioto.

O ELISA para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* utilizando LCR apresentou maior sensibilidade (100%) em relação ao mesmo ensaio em amostras de soro (95,1%) para o *cut off* b_1 de 1,12 (Fig. 17 e Tabela 1), enquanto que a especificidade foi máxima (100%) com ambos os materiais biológicos. A análise estatística demonstrou diferença significativa entre os grupos NC e controle negativo ($p < 0,0001$, teste Mann-Whitney), bem como entre os grupos NC e OP.

De forma geral, melhor sensibilidade e especificidade do ELISA são obtidas utilizando-se LCR ao invés de soro (BUENO *et al.*, 2005; CHUNG *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006), embora FERRER *et al.* (2009) tenham relatado sensibilidade ligeiramente maior usando soro. BUENO *et al.* (2000) e DEL BRUTO *et al.* (2001) defendem algumas vantagens da utilização do soro para o imunodiagnóstico da NC, como a coleta menos invasiva em relação ao LCR, além da fácil utilização em estudos soropidemiológicos em áreas endêmicas.

Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram-se com melhor sensibilidade (95,1 % para soro e 100% para LCR) quando comparados aos antígenos recombinantes obtidos a partir de *T. saginata* (FERRER *et al.*, 2007b), cuja sensibilidade foi de 77,4% para o antígeno HP6-Bac e 80,6% para o antígeno HP6-GST frente a soro, enquanto que para LCR a sensibilidade obtida foi de 76,9% e 73,1%, respectivamente. Já para antígenos recombinantes baseados em *T. solium*, o antígeno Tc14 apresentou melhores índices de sensibilidade quando comparado ao antígeno GF-18 e HF-18, com sensibilidades respectivas de 86 e 58% (MONTERO *et al.*, 2003) utilizando-se soro, bem como ao antígeno rtsM (CHUNG *et al.*, 2005), que apresentou sensibilidade de 91,1% para soro e 97,8% para LCR, enquanto que as especificidades foram de 94,3 e 96,4%, respectivamente.

Já, BUENO *et al.* (2005) testaram dois antígenos recombinantes baseados em *T. solium*, denominados rGP50 e Ts18var1, frente a soro e LCR de pacientes com NC, obtendo índices de sensibilidade de 94,7% (soro) e 100% (LCR) e especificidade de 93,8% (soro) e 100% (LCR) quando utilizado o antígeno rGP50; enquanto que para o antígeno Ts18var1 os índices de sensibilidade foram 90,4% (soro) e 90,2% (LCR) e a especificidade encontrada foi de 90,3% (soro) e 98% (LCR). Podemos verificar que a proteína Tc14 apresentou desempenho semelhante ao antígeno rGP50 ao utilizarmos LCR, porém com maior sensibilidade e especificidade ao utilizarmos soro. O mesmo se deu ao compararmos o presente trabalho com o relatado por SAKO *et al.* (2006), que apresentaram sensibilidade de 94,3% em ELISA com o antígeno recombinante quimérico Ag1V1/Ag2.

Por outro lado, SILVA *et al.* (2006) relataram sensibilidade de 97% para soro e 100% para LCR utilizando o antígeno recombinante Ts14, proveniente de *T. solium*,

assim como FERRER *et al.* (2007a) demonstraram maior sensibilidade (96,1%), embora com menor especificidade (93,1%) ao utilizar a proteína TS8B2 frente a soro de indivíduos acometidos pela NC.

Considerando que alguns autores discutem o papel da glicosilação em contribuição à antigenicidade das proteínas nativas de *T. solium* (BUENO *et al.*, 2005; HANCOCK *et al.*, 2003; TSANG, BRAND & BOYER, 1989), provavelmente a falta de glicosilação da proteína Tc14 obtida neste estudo justifique o não reconhecimento da mesma por duas amostras de soro de pacientes com NC em ELISA (Fig. 17).

Ao verificarmos a reatividade cruzada das amostras de soro de indivíduos acometidos por outras parasitoses frente ao antígeno Tc14, foi observada reatividade com uma amostra de soro de indivíduo com hidatidose e outra proveniente de indivíduo com estrongiloidíase, gerando um índice de positividade de 3,9% para o grupo de outras parasitoses no teste ELISA (Tabela 1). ISHIDA *et al.* (2003) apresentaram reatividade de 77,2% entre amostras de hidatidose e antígeno LVTcra. KONG *et al.* (1989) também demonstraram reatividade entre amostras de hidatidose e o antígeno de LVTcra. Da mesma forma, KOOSHA, FESHARAKI & ROKNI (2004) relataram reatividade cruzada entre amostras de estrongiloidíase com o antígeno de *Echinococcus granulosus*. Além disso, SATO *et al.* (2006) mostraram forte reatividade cruzada entre as amostras de hidatidose e o antígeno de *T. solium* purificado em análise por Imunoblot. Provavelmente, o antígeno recombinante aqui obtido conserva alguns dos epítomos responsáveis pela reatividade cruzada, proporcionando o reconhecimento do mesmo por alguns indivíduos acometidos por outras parasitoses.

Em concordância com nossos resultados, outros autores também encontraram reatividade cruzada entre os antígenos recombinantes produzidos e soro de indivíduos com outras parasitoses, como SILVA *et al.* (2006), que relataram 15% de reatividade cruzada do antígeno recombinante Ts14 e amostras provenientes de indivíduos com teníase, assim como MONTERO *et al.* (2003) que demonstraram reatividade cruzada entre o Ag G-F18 e soros de indivíduos com esquistossomose. Somado a isso, CHUNG *et al.* (2005) relataram 17,3% de positividade do antígeno recombinante rTsM com amostras de hidatidose. Vale ressaltar que, HANCOCK *et al.* (2008) relataram porcentagem de falso positivo em Imunoblot de 23,5% para esquistossomose, 5,0%

para fasciolose, 3,36% para ascaridíase, 1,68% para teníase e hidatidose com o antígeno rGP50 (recombinante derivado de *T. solium*), sendo que, após a mudança do sistema de expressão das células *High Five* para as células Sf9 todas as amostras não reagiram, demonstrando a interferência em relação ao sistema de expressão nos testes imunoenzimáticos.

6.2.4. Correlação entre os testes

A análise comparativa entre o Imunoblot Tc14 e o Imunoblot LLGP (TSANG, BRAND & BOYER, 1989) mostrou-se com um perfil semelhante de positividade, já que todas as amostras realizadas foram detectadas em ambos os testes (Tabela 2). O pequeno número de tiras disponíveis do Imunoblot LLGP não permitiu análise de um número maior de amostras, impossibilitando o estudo para o estabelecimento de parâmetros de sensibilidade e especificidade comparativas. Ao analisarmos as mesmas amostras em ELISA utilizando os antígenos 18/14 ou Tc14, este apresentou menor reatividade em relação ao antígeno 18/14. Uma possível explicação para este evento deve levar em consideração o fato de que as proteínas 18/14 são ricamente glicosiladas, o que pode ter contribuído potencialmente para a reatividade encontrada na amostra, já que é sabido que alguns anticorpos reconhecem a fração glicosilada dos antígenos nativos e/ou purificados (SATO *et al.*, 2006).

6.3. IMUNOESTIMULAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE *IN VITRO* E DOSAGEM DE CITOCINAS

A função da resposta imune celular sistêmica na NC ainda é pouco esclarecida. A maioria dos relatos existentes na literatura envolvem, de forma geral, pacientes na fase ativa da doença, demonstrando supressão *in vitro* após estímulo com concavalina A e antígeno total de *T. solium* (CORREA *et al.*, 1989; FLISSER, PEREZMONTFORT & LARRALDE, 1979) e de *T. crassiceps* (BUENO *et al.*, 2001, 2004), embora MEDINA-

ESCUZIA *et al.* (2001) tenham relatado que não ocorre imunossupressão em pacientes com NC.

Dados da literatura sugerem que a resposta imunológica no sistema nervoso central de pacientes sintomáticos consiste em uma predominância do padrão Th1 (RESTREPO *et al.*, 1998) ou resposta mista Th1, Th2 e Th3 (RESTREPO *et al.*, 2001a,b) resultando, respectivamente, na formação ou ausência de granuloma. Embora WHITE (1997) relatou que a resposta Th1 hiperinflamatória prevalente na fase sintomática seja a responsável pela mortalidade associada à doença, MISHRA *et al.* (2009) ressaltaram que as evidências da contribuição da resposta Th1 para a neuropatologia e severidade da doença são limitadas. CHAVARRIA *et al.* (2003) relataram que indivíduos que apresentaram a doença de forma subclínica possuíam um padrão de resposta predominantemente Th2. Estes autores propuseram que os indivíduos de áreas endêmicas que são expostos, porém não adquirem a cisticercose devem possuir padrão balanceado entre Th1/Th2, enquanto que os indivíduos suscetíveis à aquisição da doença provavelmente apresentam predominância de padrão Th2. Além disso, ROBINSON *et al.* (1997) demonstraram em modelo animal que a resposta responsável pela destruição completa do parasita apresentou padrão misto Th1/Th2.

Vários estudos em modelo de cisticercose experimental têm procurado determinar as causas da imunossupressão observada na cisticercose, com diferentes conclusões como: liberação de produtos antigênicos (TATO *et al.*, 1995) que formam imunocomplexos circulantes (LETONJA, HAMMERBERG & SCHURIG, 1987) e suprimem a produção de citocinas pelos linfócitos (ARECHAVALETA, MOLINARE & TATO, 1998), aumento e/ou diminuição de linfócitos T citotóxicos dependendo da fase evolutiva da doença (MEEUSEN *et al.*, 1989); instabilidade genética e alterações cromossômicas nos linfócitos circulantes induzidas pela infecção (FLISSER *et al.*, 1990; HERRERA *et al.*, 1994).

De forma geral, os antígenos de secreção e excreção dos cisticercos têm sido descritos como supressores da resposta imunológica em humanos (BUENO *et al.*, 2001; MOLINARI *et al.*, 1990, 1993) e em murinos (ARECHAVALETA, MOLINARE & TATO, 1998; TATO *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2008).

Embora a resposta imunológica humoral tenha sido evidenciada pela reatividade dos plasmas dos pacientes com NC em ELISA para pesquisa de anticorpos anti-cisticerco de *T. solium* com o antígeno Tc14 (Fig. 21), nem todos os pacientes com NC apresentaram linfoproliferação positiva nas diferentes concentrações antigênicas de Tc14 (Tabela 3 e Fig. 18), sendo que o estímulo com 0,4 µg de Tc14/poço resultou em positividade de 50% no grupo controle positivo, enquanto que não foi observada linfoproliferação nas amostras controle negativo frente às diferentes concentrações do respectivo antígeno utilizadas (Fig.18 e 19). Assim é provável que a resposta imunológica humoral seja formada logo ao início da infecção, ainda com a resposta celular não definida contra todos os componentes antigênicos do parasita. Em concordância com nossos resultados MEDINA-ESCUZIA *et al.* (2001) relataram maior proliferação celular utilizando-se células de indivíduos com NC em relação a do grupo controle frente ao extrato do parasita, embora sem diferença estatística significativa.

Tanto as células dos pacientes do grupo NC quanto a dos indivíduos do grupo controle responderam fortemente ao estímulo com fitohemaglutinina, diferentemente do observado por THUSSU *et al.* (1997) que relataram um menor nível de linfoproliferação nas amostras de indivíduos com NC, embora sem diferença estatística significativa entre o grupo de doentes e o grupo controle.

Apesar de não terem sido realizados ensaios de citometria para quantificação de linfócitos dos pacientes submetidos à linfoproliferação, vale ressaltar que estudos anteriores demonstraram que a quantidade de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ permanece dentro dos níveis de normalidade nos pacientes com NC (BUENO *et al.*, 1999; THUSSU *et al.*, 1997).

Assim como a análise da proliferação celular frente a estímulos antigênicos, o estudo das citocinas tem importante papel para a caracterização de linfócitos em Th1 e Th2 (KESLO, 1998), sendo estes mediadores solúveis necessários para comunicação intercelular, coordenando as respostas que envolvem o sistema imunológico, estando envolvidos em sinais para proliferação, diferenciação e ativação de várias células quando ligadas a receptores de alta afinidade (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008).

Em geral, os estudos relacionados à produção de citocinas na NC incluem sua detecção direta no LCR e/ou soro de pacientes. ROLFS *et al.* (1995) relataram que a

resposta imunológica na NC é predominantemente intratecal, envolvendo tanto mecanismos humorais (detecção de IgG específica) quanto celulares (detecção de IL-1 e receptor de IL-2). Em amostras de LCR de pacientes com cistos no espaço subaracnóideo, OSTROSKYZEICHNER *et al.* (1996) detectaram concentrações elevadas de IL-1 e IL-6, enquanto que as concentrações de TNF- α e IFN- γ foram similares as do grupo controle. EVANS *et al.* (1998) descreveram concentrações elevadas de IL-5 e IL-6 no LCR e de IL-5 no soro de pacientes com NC sintomática, enquanto que MEDINA-ESCUZIA *et al.* (2001) relataram a detecção de RNAm para IL-2 em pacientes com NC. CHAVARRIA *et al.* (2003) encontraram altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 em LCR de pacientes com NC.

Nosso estudo, por sua vez, avaliou a produção de IL-10 e IFN- γ *in vitro* por células de indivíduos do grupo com NC e do grupo controle negativo (Fig. 20). Não foi possível detectar IFN- γ em ambos os grupos, enquanto que as concentrações de IL-10 encontradas no grupo NC variaram de indetectável (duas amostras não reagentes) a 550 pg.mL⁻¹. No grupo controle, somente uma amostra mostrou-se reagente para esta citocina, na concentração de 250 pg.mL⁻¹. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que este indivíduo do grupo controle tenha entrado em contato com outros parasitas que apresentam reatividade cruzada com antígenos compartilhados entre a forma adulta e a forma larvária do parasita *T. solium* (ESPINOZA *et al.*, 1986; LARRALDE *et al.*, 1989; OLIVO, PLANCARTE & FLISSER, 1988). Houve diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p = 0,0053$, teste Mann-Whitney).

Corroborando com nossos dados, CHAVARRIA *et al.* (2005) relatam o aumento de IL-10 e a ausência de IFN- γ em LCR de pacientes com NC. Embora estudos adicionais envolvendo outras citocinas sejam necessários, nossos resultados da detecção de citocinas somados à proliferação celular sugerem uma predominância de resposta imunológica para Th2, justificando a ausência de diferença estatisticamente significativa na linfoproliferação entre os grupos (Fig. 18), já que a IL-10 tem a capacidade de inibir muitas das funções de macrófagos ativados, sendo um inibidor da produção de IFN- γ (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2008), embora não podemos descartar a possibilidade da resposta imunológica destes pacientes apresentarem padrão misto, como sugerem a análise dos isótipos (Tabela 4). Em concordância com

nossos resultados CHAVARRIA *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa na produção de IFN- γ entre o grupo controle e o grupo NC, enquanto que os pacientes com NC apresentavam aumento de IL-10, IL-5 e IL-6. Adicionalmente, MEDINA-ESCUZIA *et al.* (2001) relataram frequência semelhante na detecção de RNAm entre o grupo controle e o grupo NC em cultura celular após estímulo antigênico para as citocinas IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-10, sendo que somente pacientes com múltiplos cisticercos apresentaram o RNAm para IL-10.

Muito ainda deve ser estudado sobre a resposta imunológica envolvida na NC. CHAVARRIA *et al.* (2005) sustentam a hipótese de que a localização do parasita no sistema nervoso central pode desencadear diferentes perfis de resposta imunológica *in vivo*, sendo que parasitas presentes no parênquima cerebral suscitariam uma resposta com baixa concentração de citocinas e de anticorpos específicos que poderiam ser encontrados no LCR. Parasitas localizados na subaracnóide apresentariam, por sua vez, um perfil similar, porém com altos níveis de anticorpos presentes no LCR, enquanto que parasitas intraventriculares induziriam uma resposta imunológica com altos níveis de IL-5, IL-6, IL-10 e subclasses específicas de anticorpos.

6.4. DETERMINAÇÃO DE ISÓTIPOS

Desde a descoberta sorológica das subclasses de IgG é sabido que existem diferenças biológicas não só relacionadas à sua morfologia, mas também a seu papel na resposta imunológica (NATVIG & KUNKEL, 1973). A presença de antígenos de secreção-excreção e proteínas liberadas pela degeneração do cisticerco no hospedeiro é capaz de estimular a produção de imunoglobulinas específicas, dentre as quais o predomínio isotípico está relacionado à fase da infecção (ABRAHAM *et al.*, 2004; MOLINARI *et al.*, 2002).

Ao analisarmos os plasmas de indivíduos com NC frente ao antígeno Tc14, foi encontrada taxa de positividade 75% para IgG1 (9 de 12 amostras), 33,3% para IgG2 (4 de 12 amostras), 50% para IgG3 (6 de 12 amostras) e 25% para IgG4 (3 de 12 amostras) (Fig. 22). Assim como o esperado, não houve reatividade para os diferentes isótipos no grupo controle negativo. Diferentemente dos resultados aqui apresentados,

CHAVARRIA *et al.* (2005) encontraram predomínio de IgG4 em soro de indivíduos com NC, relatando taxa de positividade de 100% de IgG4, 10% de IgG3 e 30% de IgG2 em pacientes com NC. Por outro lado, MALLA *et al.* (2005) demonstraram em teste ELISA com antígeno bruto de cisticerco de *T. solium* índices de sensibilidade de 68,2% (para IgG1) e 65,2% (para IgG4) com especificidade de 93,2% e 91,6% respectivamente para IgG1 e IgG4 em saliva, enquanto que para soro as sensibilidades obtidas foram de 71,4% (para IgG2) e 68,2% para (IgG4), sendo a especificidade de 90,2% para ambos isótipos.

Já em estudos anteriores CHAVARRIA *et al.* (2003) encontraram aumento de IgG4 no plasma de pacientes assintomáticos, sugerindo que a predominância Th2 promove a evolução silenciosa da doença. A análise individual da reatividade dos isótipos sugere que 5 pacientes participantes deste estudo apresentaram resposta mista, sendo encontrados em seu soro tanto anticorpos de padrão Th1 quanto Th2 (Tabela 4). Vale ressaltar que o ELISA realizado para a detecção de isótipos tratava de ELISA Indireto e não de Captura, dessa forma isótipos presentes em grande quantidade podem mascarar a detecção de isótipos em baixa concentração.

Por outro lado, SHORT *et al.* (1990) detectaram aumento de IgE total e presença de IgG4 específica contra antígenos provenientes de cisticercos de *T. solium* em soro e LCR de indivíduos com NC. Corroborando com este achado, HUANG *et al.* (2002) encontraram positividade de 97,8% para IgG4 em soro de pacientes com NC utilizando anticorpos monoclonais direcionados para a captura desse isótipo.

Vale ressaltar que na NC a predominância das subclasses não está esclarecida, provavelmente devido a heterogeneidade encontrada em indivíduos acometidos pela doença em relação à sintomatologia e resposta imunológica frente ao parasita (SCHANTZ *et al.*, 1996). Dessa forma, muito ainda deve ser estudado para melhor compreendermos a NC e a relação complexa estabelecida entre o parasita e seu hospedeiro.

7. Conclusões

Analisando os resultados obtidos no presente estudo, concluímos que:

- Foi gerada proteína recombinante de aproximadamente 14 kDa em *E. coli* (DE3) BL-21, denominada Tc14.
- O compartilhamento de epítomos entre a proteína Tc14 e os antígenos de baixo peso molecular de *T. solium* e *T. crassiceps* foi demonstrado pela reatividade com os AcMo em Imunoblot. Sua utilização em imunoenaios frente a amostras de soro e LCR mostrou-se promissora tanto em ELISA (S e E de 100% para LCR e de 95,1% e 100%, respectivamente, para soro) quanto em Imunoblot (somente o grupo NC apresentou reatividade).
- Os estudos comparativos com diferentes antígenos (Tc14, LVTcra, ES, 18/14, Total-Tso e LLGP) demonstraram que o IBTc14 apresentou os mesmos resultados que o IBLLGP (ensaio de referência) e taxa de positividade superior aos outros antígenos. Já em ELISA, o antígeno 18/14 apresentou maior reatividade (uma amostra reagente a mais) do que o Tc14, sendo que a amostra não reagente no ELISA foi reagente no Imunoblot utilizando o antígeno Tc14.
- Foi possível verificar a imunoestimulação de células mononucleares e produção de IL-10 no grupo NC, não sendo possível detectar IFN- γ . A dosagem de isótipos demonstrou positividade de 75% para IgG1, 33,3% para IgG2, 50% para IgG3 e 25% para IgG4. A análise conjunta dos dados sugere padrão misto Th1/Th2 para 5 de 12 pacientes deste estudo.

Dessa forma, concluímos que o antígeno recombinante Tc14 mostrou-se como ferramenta promissora para imunoenaios na NC, abrindo uma nova perspectiva envolvendo estudos a serem realizados sobre diferentes sistemas de expressão e antigenicidade frente a um número maior de amostras.

Referências Bibliográficas

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Citocinas. In:____. **Imunologia Celular & Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 11, p. 297-301.
- ABRAHAM, R.; PARDINI, A.X.; VAZ, A.J; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.D. *Taenia* antigens detection in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis and its relationship with clinical activity of the disease. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 62, n. 3B, p. 756-760, 2004.
- AGAPEJEV, S. Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, n. 3B, p. 822-828, 2003.
- ARAÚJO, T.D. **Expressão heteróloga em sistema procarioto da NTPDase-1 do *Trypanosoma cruzi* e avaliação do potencial uso no imunodiagnóstico na doença de Chagas**. Ouro Preto, 2008, 99p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto.
- ARECHAVALETA, F.; MOLINARE, J.L.; TATO, P.A. *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. **Parasitol. Res.**, v. 84, sp. iss. 2, p. 117-122, 1998.
- BERN, C.; GARCIA, H.H.; EVANS, C.; GONZALEZ, A.E.; VERASTEGUI, M.; TSANG, V.C.W.; GILMAN, R.H. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. **Clin. Infect. Dis.**, v. 29, sp. iss. 5, p. 1203-1209, 1999.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, sp. iss. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMURA, P.M.; ESPINDOLA, N.M; PARDINI, A.; BUENO, E.C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos coqueiros, SP) determined by Elisa and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 7-12, 2002.
- BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; OLIVEIRA, C.A. MACHADO LR, LIVRAMENTO JA, MIELLI SR, UEDA M. Analysis of cells in cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis by means of flow cytometry. **Cytometry.**, v. 38, sp. iss. 3, p. 106-110, 1999.
- BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.D.; LIVRAMENTO, J.A., MIELLE, S.R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, sp. iss. 1, p. 146-151, 2000.

- BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; AVILA, S.L.M.; FERREIRA, A.W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 126, sp. iss. 2, p. 304-310, 2001.
- BUENO, E.C.; MACHADO, L.M.; LIVRAMENTO, J.A.; VAZ, A.J. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). **Acta Trop.**, v. 91, sp. iss. 2, p. 205-213, 2004.
- BUENO, E.C.; SCHEEL, C.M.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; TSANG, V.C.W.; HANCOCK, K. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, sp. iss. 3, p. 278-283, 2005.
- CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W.A. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, v. 39, sp. iss. 10, p. 1025-1040, 1998.
- CARPIO, A.; HAUSER, W.A. Prognosis for seizure recurrence in patients with newly diagnosed neurocysticercosis. **Neurology**, v. 59, sp. iss. 11, p. 1730-1734, 2002.
- CHART, H.; SMITH, H.R.; LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 alpha and EQ1. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, sp. iss. 6, p. 1048-1058, 2000.
- CHAVARRIA, A.; ROGER, B.; FRAGOSO, G.; TAPIA, G.; FLEURY, A.; DUMAS, M.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. **Microbes Infect.**, v. 5, sp. iss. 12, p.1109-1115, 2003.
- CHAVARRIA, A.; FLEURY, A.; GARCIA, E.; MARQUEZ, C.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. **Clin. Immunol.**, v. 116, sp. iss. 3, p.271-278, 2005.
- CHERMETTE, R.; BUSSIERAS, J.; MARIONNEAU, J.; BOYER, E.; ROUBIN, C.; PROPHETTE, B.; MAILLARD, H.; FABIANI, B. *Taenia-crassiceps* invasive cysticercosis in an AIDS patient. **Bull. Acad. Natl. Med.**, v. 179, sp. iss. 4, p. 777-783, 1995.
- CHIMELLI, L.; LOVALHO, A.F.; TAKAYANAGUI, O.M. Neurocysticercosis: contribution of autopsies to consolidation of the compulsory notification in Ribeirao Preto SP, Brazil. **Arq. Neuro-psiquiatr.**, v. 56, sp. iss. 3B, p. 577-584, 1998.
- CHUNG, J.; BAHK, Y.Y.; HUH, S.; KANG, S.Y.; KONG, Y.; CHO, S.Y. A recombinant 10 kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. **J. Infect. Dis.**, v. 180, sp. iss. 4, p.1307-1315, 1999.

- CORREA, D.; TOVAR, A.; ESPINOZA, B.; PLANCARTE, A.; FLISSER, A. Cisticercosis humana: relación inmunologica hosped-parasito. Press, 1989. *apud Cysticercosis humana y porcina: su conocimiento e invetigacion en Mexico*. México: Editorial Limusa, 1989. p. 31-43.
- COSTA, J.M., FERRERIRA, A.W., MAKINO, M.M., CAMARGO, M.E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 24, n.6, p. 337-341, 1982.
- CRAIG, P.S.; ROGAN, M.T.; ALLAN, J.C. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv. Parasit.*, v. 38, p.169-250, 1996.
- CROWE, J. DOBELI, H, GENTZ, R., HOCHULI, E., STUBER, D., HENCO, K. 6XHis-Ni-NTA cchormatography as a superior techniqe in recombinant protein expression/purification. **Methods Mol. Biol.**, v. 31, p. 371-87, 1994.
- DEL BRUTTO, O.H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE, A.C.; TSANG, V.C.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; SCHANTZ, P.M.; EVANS, C.A.W.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J.C.; SARTI, E.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; GARCIA, H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, v. 57, sp. iss. 2, p.177-183, 2001.
- DELOBEL, P.; SIGNATE, A.; EL GUEDJ, M.; COUPPIE, P.; GUEYE, M.; SMADJA, D.; PRADINAUD, R. Unusual form of neurocysticercosis associated with HIV infection. **Eur. J. Neurol.**, v.11, sp. iss. 1, p.55-58, 2004.
- ESPINDOLA, N.M; GASPARI, E.N.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. **Vet. Parasitol.**, v. 89, sp. iss. 4, p. 321-326, 2000.
- ESPINDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.X.; FERNANDEZ, I. 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. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 96, sp. iss. 4, p. 361-368, 2002.
- ESPINDOLA, N.M. Characterization of *Taenia crassiceps* cysticerci and their application to diagnosis of the human cysticercosis. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 62, sp. iss. 2A, p. 372-372, 2004.
- ESPINDOLA, N.M.; IHA, A.H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O.M.; MACHADO, L.D.; LIVRAMENTO, J.A.; MAIA, A.A.M.; PERALTA, J.M.; VAZ, A.J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, sp. iss. 7, p. 3178-3184, 2005.

- ESPINOZA, B.; RUIZ-PALACIOS, G.; TOVAR, A.; SANDOVAL, M.A.; PLANCARTE, A.; FLISSER, A. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, sp. iss. 4, p. 536-541, 1986.
- EV, L.V.; MAIA, A.A.M.; PIANETTI, G.; NASCIMENTO, E. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitol. Res.**, v. 85, sp. iss. 2, p. 98-102, 1999.
- EVANS, C.A.W.; GARCIA, H.H.; HARTNELL, A.; GILMAN, R.H.; JOSE, P.J.; MATINEZ, M.; REMICK, D.G.; WILLIAMS, T.J.; FRIEDLAND, J.S. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. **Infect. Immun.**, v. 66, sp. iss. 9, p. 4522-4525, 1998.
- FELDMAN, M.; PLANCARTE, A.; SANDOVAL, M.; WILSON, M.; FLISSER, A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, sp. iss. 4, p. 559-562, 1990.
- FERRER, E.; CORTEZ, M.M.; CABRERA, Z.; ROJAS, G.; DÁVILA, I.; NOYA, B.A.; PEREZ, H.A.; FERNANDEZ, I.; ROMERO, H.U.; HARRISON, L.J.S.; MICHAEL, R.; PARKHOUSE, E.; GÁRATE, T. Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, sp. iss. 8, p. 568-576, 2005.
- FERRER, E.; BONAY, P.; FOSTER-CUEVAS, GONZÁLEZ, L.M., DÁVILA, I., CORTÉZ, M.M., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., GÁRATE, T. Molecular cloning and characterization of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, the new members of the *Taenia solium* metacestode 8KDa diagnostic antigen family. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 152, p. 90-100, 2007a.
- FERRER, E.; GONZÁLEZ, L.M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J.A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M.E.; CORTÉZ, M.M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GARATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospheral adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitol. Res.**, v. 101, sp. iss. 3, p. 517-525, 2007b.
- FERRER, E.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J.A.; BARDERAS, M.E.G.; GONZÁLEZ, L.M.; CORTÉZ, M.M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Peptide epitopes of the *Taenia solium* antigen TS8B2 are immunodominant in human and porcine cysticercosis. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 168, sp. iss. 2, p. 168-171, 2009.
- FISCHER, C.; NOSRATIAN, R.; HABTEMICHAEL, N.; TOLLE, R.; RIEMENSCHNEIDER, V.; GEYER, E. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific

- immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 45, sp. iss. 4, p. 324-328, 1994.
- FLEURY, A.; DESSEIN, A.; PREUX, P.M.; DUMAS, M.; TAPIA, G.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Symptomatic human neurocysticercosis. Age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. **J. Neurol.**, v. 251, sp. iss. 7, p. 830-837, 2004.
- FLISSER, A.; PEREZMONTFORT, R.; LARRALDE, C. Immunology of human and animal cysticercosis - review. **Bull. World Health Organ.**, v. 57, sp. iss. 5, p. 839-856, 1979.
- FLISSER, A.; GONZALEZ, D.; PLANCARTE, A.; OSTROSKY, P.; MONTERO, R.; STEPHANO, A.; CORREA, D. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis .2. Immunological and cytogenetic studies. **Parasitol. Res.**, v. 76, sp. iss. 7, p. 640-642, 1990.
- FLISSER, A. Taeniasis-Cysticercosis: an introduction. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 22, p. 233-235, 1991.
- FLISSER, A.; MADRAZO, I.; PLANCARTE, A.; SCHANTZ, P.; ALLAN, J.; CRAIG, P.; SARTI, E. Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniacidal dose of praziquantel. **Lancet**, v. 342, p. 748, 1993.
- FLISSER, A.; GAUCI, C.G.; ZOLI, A.; MARTINEZ-OCANA, J.; GARZA-RODRIGUEZ, A.; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J.L.; MARAVILLA, P.; RODRIGUEZ-CANUL, R.; AVILA, G.; AGUILAR-VEJA, L.; KYNGDON, C.; GEERTS, S.; LIGHTOWLERS, M.W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. **Infect. Immun.**, v. 72, sp. iss 9, p. 5292-5297, 2004.
- FRANCOIS, A.; FAVENNEC, L.; CAMBON-MICHOT, C.; GUEIT, I.; BIGA, N.; TRON, F.; BRASSEUR, P.; HEMET, J. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis - A new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, sp. iss. 4, p. 488-492, 1998.
- FREITAS, M.G. Teníase e cisticercose. In:____. **Helmintologia Veterinária**. Belo Horizonte: Rabelo, 1980. cap. X, p. 112-117.
- GARCIA, H.H.; MARTINEZ, M.; GILMAN, R.; HERRERA, G.; TSANG, V.C.W.; PILCHER, J.B.; DIAZ, F.; VERASTEGUI, M.; GALLO, C.; PORRAS, M.; ALVARADO, M.; NARANJO, J.; MIRANDA, E. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. **Lancet**, v. 338, sp. iss. 8766, p. 549-551, 1991.
- GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 14, sp. iss. 1, p. 97-119, 2000.

- GARCIA, H.H.; EVANS, C.A.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; WHITE, A.C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V.C.W.; SCHANTZ, P.M.; ALLAN, J.C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J.S.; MARTINEZ, S.M.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; DEL BRUTTO, O.H. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, sp. iss. 4, p. 747-756, 2002.
- GARCIA, H.H.; GONZALES, A.E.; GILMAN, R.H. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, sp. iss. 5, p. 411-419, 2003a.
- GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Lancet**, v. 362, sp. iss. 9383, p. 547-556, 2003b.
- GARG, R.K. Single enhancing computerized tomography-detected lesion in immunocompetent patients. **Neurosurg. Focus**, v. 12, sp. iss. 6, p. 110-114, 2002.
- GAUCI, C.G.; VERASTEGUI, M.R.; GILMAN, R.H.; LIGHTOWLERS, M.W. *Taenia solium* and *Taenia ovis*: stage-specific expression of the vaccine antigen genes, TSOL18, TSOL16, and homologues, in oncospheres. **Exp. Parasitol.**, v. 113, sp. iss. 4, p. 272-275, 2006.
- GENEVA. Provisional agenda item 13.18. WHO - World Health Organization. Control of neurocysticercosis. Fifty-fifth World Health Assembly, A55/23, 5 abril 2002. p. 4.
- GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K.; LARRALDE, C.; HERNANDEZ, M.; ALMAGRO, J.C.; VIVEROS, M.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; SCIUTTO, E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. **Immunol. Lett.**, v. 49, sp. iss. 3, p. 185-189, 1996.
- GREWAL, J.S.; KAUR, S.; BHATTI, G.; SAWHNEY, I.M.S.; GANGULY, N.K.; MAHAJAN, R.C.; MALLA, N. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. **Parasitol. Res.**, v. 86, sp. iss. 6, p. 500-5003, 2000.
- GOEBBELS, R.P.J. **Obtenção ex-vivo de antígenos de excreção e secreção de cisticercos de *Taenia crassiceps***. São Paulo, 2008, 75p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Universidade de São Paulo.
- GOMES, A.B.; SOARES, K; BUENO, E.C.; ESPINDOLA, N; IHA, A.; MAIA, A.A.; PERALTA, R.H.S.; VAZ, A.J. Comparative evaluation of different immunoassays for the detection of *Taenia solium* cysticercosis in swine with low parasite burden, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 725-731, 2007.

- GREENE, R.M.; HANCOCK, K.; WILKINS, P.P.; TSANG, V.C.W. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. **J. Parasitol.**, v. 86, sp. iss. 5, p. 1001-1007, 2000.
- HANCOCK, K.; KHAN, A.; WILLIAMS, F.B.; YUSHAK, M.L.; PATTABHI, S.; NOH, J.; TSANG, V.C.W. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, sp. iss. 6, p. 2577-2586, 2003.
- HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; GREENE, R.M.; YUSHAK, M.L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, J.W.; LEVINE, M.Z.; TSANG, V.C.W. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis (vol 133, pg 115, 2004). **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 113, sp. iss. 2, p. 285-285, 2004.
- HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; WHITFIELD, F.W.; YUSHAK, M.L.; LANE, W.S.; GARCIAC, H.H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 147, sp. iss. 1, p.109-117, 2006.
- HANCOCK, K.; NARANG, S.; PATTABHI, S.; YUSHAK, M.L.; KHAN, A.; LIN, S.C.; PLEMONS, R.; BETENBAUGH, M.J.; TSANG, V.C.W. False positive reactivity of recombinant, diagnostic, glycoproteins produced in High Five (TM) insect cells: Effect of glycosylation. **J. Immunol. Methods**, v. 330, sp. iss. 1-2, p. 130-136, 2008.
- HANDALI, S.; KLARMAN, M.; GASPARD, A.N.; NOH, J.; LEE, Y.M.; RODRIGUEZ, S.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Multiantigen Print Immunoassay for Comparison of Diagnostic Antigens for *Taenia solium* Cysticercosis and Taeniasis. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, sp. iss. 1, p. 68-72, 2010.
- HERNANDEZ, M.; CABRERA-PONCE, J.L.; FRAGOSO, G.; LOPEZ-CASILLAS, F.; GUEVARA-GARCIA, A.; ROSAS, G.; LEON-RAMIREZ, C.; JUAREZ, P.; SANCHEZ-GARCIA, G.; CERVANTES, J.; ACERO, G.; TOLEDO, A.; CRUZ, C.; BOJALIL, R.; HERRERA-ESTRELLA, L.; SCIUTTO, E. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. **Vaccine**, v. 25, sp. iss. 21, p. 4252-4260, 2007.
- HERRERA, L.A.; SANTIAGO, P.; ROJAS, G.; SALAZAR, P.M.; TATO, P.; MOLINARI, J.L.; SCHIFFMANN, D.; OSTROSKYWEGMAN, P. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. **Mutat. Res.-Rev. Mutat. Res.**, v. 305, sp. iss. 2, p. 223-228, 1994.
- HUANG, B.C.; LI, G.P.; JIA, F.J.; LIU, F.M.; GE, L.Y.; LI, W.; CHENG, Y.L. Determination of specific IgG4 for diagnosis and therapeutic evaluation of cerebral cysticercosis. **Chin. Med. J.**, v. 115, sp. iss. 4, p. 580-583, 2002.

- HUBERT, K.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; MICHAULT, A.; FROSCH, M.; MUHLSCHLEGEL, F.A. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticercosis cysticerci. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 6, sp. iss. 4, p. 479-482, 1999.
- HUISA, B.N.; MENACHO, L.A.; RODRIGUEZ, S.; BUSTOS, J.A.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H. Taeniasis and cysticercosis in housemaids working in affluent neighborhoods in Lima, Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, sp. iss. 3, p. 496-500, 2005.
- INVITROGEN. **User Manual**: Pichia Expression Kit. For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. Manual part no. 25-0043. [Catalog no. K1710-01], 2009. 98p. [version MAN0000012 dez. 2009]. Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf. Acesso em: 29 agosto 2010.
- ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Trop.**, v. 89, sp. iss. 1, p. 73-84, 2003.
- ITO, A.; CRAIG, P.S. Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. **Trends Parasitol.**, v. 19, sp. iss. 9, p. 377-391, 2003.
- ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.H.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.N.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59, sp. iss. 2, p. 291-294, 1998.
- ITO, A.; PUTRA, M.I.; SUBAHAR, R.; SATO, M.O.; OKAMOTO, M.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; CRAIG, P.S.; MARGONO, S.S. Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. **J. Helminthol.**, v. 76, sp. iss. 4, p. 311-314, 2002.
- JANA, S.; DEB, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, sp. iss. 3, p. 289-298, 2005.
- KALINNA, B.H.; McMANUS, D.P. Cloning and characterization of a ribosomal P protein from *Taenia solium*, the etiological agent of human cysticercosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 219, sp. iss. 1, p. 231-7, 1996.

- KANE, JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia-coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, sp. iss. 5, p. 494-500, 1995.
- KESLO, A. Cytokines: principles and prospects. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 76, sp. iss. 4, p. 300-317, 1998.
- KONG, Y.; KANG, S.Y.; CHO, S.Y.; MIN, D.Y. Cross-reacting and specific antigenic components in cystic fluid from metacestodes of *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*. **Korean Journal of Parasitology (Kisaengchunghak Chapchi.)**, v. 27, sp. iss. 2, p. 131-139, 1989.
- KOOSHA, S.; FESHARAKI, M.; ROKNI, M.B. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 23, p. 214-216, 2004.
- KYNGDON, C.T.; GAUCI, C.G.; GONZALEZ, A.E.; FLISSER, A.; ZOLI, A.; READ, A.J.; MARTÍNEZ-OCAÑA, J.; STRUGNELL, R.A.; LIGHTOWLERS, M.W. Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. **Parasite Immunol.**, v. 28, sp. iss. 5, p. 191-199, 2006.
- LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia-solium*, *Echinococcus-granulosus*, and *Taenia-crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid-disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, sp. iss. 3, p.282-290, 1989.
- LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R.M.; PALENCIA, G.; PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; DIAZ, M.L.; SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal-fluid - antigens from murine *Taenia-crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia-solium*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 114, sp. iss. 9, p. 926-928, 1990.
- LEE, E.G.; LEE, M.Y.; CHUNG, J.Y.; JE, E.Y.; BAE, Y.A.; NA, B.K.; KIM, T.S.; EOM, K.S.; CHO, S.Y.; KONG, Y. Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-KDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 99, sp. iss. 12, p. 919-926, 2005.
- LETONJA, T.; HAMMERBERG, C.; SCHURIG, G. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaformis*. **Zeitschrift Fur Parasitenkunde - Parasitol. Res.**, v. 73, sp. iss. 3, p. 265-270, 1987.

- LEVINE, M.Z.; CALDERON, J.C.S.; WILKINS, P.P.; LANE, W.S.; ASARA, J.M.; HANCOCK, K.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Characterization, cloning, and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. **J. Parasitol.**, v. 90, sp. iss. 3, p. 631-638, 2004.
- LI, Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.55, n.2, p. 73-83, 2010.
- LIGHTOWLERS, M.W. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. **Int. J. Parasitol.**, v. 29, sp. iss. 6, p.811-817, 1999.
- LIGHTOWLERS, M.W.; ROLFE, R.; GAUCI, C.G. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. **Exp. Parasitol.**, v. 84, sp. iss. 3, p. 330-338, 1996.
- LIVRAMENTO, J.A. **Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose.** São Paulo, 1980, 135p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.
- LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R.; SPINAFRANCA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL CHILD NEUROLOGY ASSOC.: NEW TRENDS IN PEDIATRIC NEUROLOGY - INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, 6, Buenos Aires, 1992. **Proceedings Paper.** Amsterdam: Elsevier Science Publ. B.V., 1993, p. 307-312.
- LUO, X.N.; ZHENG, Y.D.; HOU, J.L.; ZHANG, S.H.; CAI, X.P. Protection against Asiatic *Taenia solium* Induced by a Recombinant 45W-4B Protein. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 16, sp. iss. 2, p. 230-232, 2009.
- MACHADO, A.B.B.; PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral de São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Publ.**, v. 22, n. 3, p. 240-244, 1988.
- MALLA, N.; KAUR, R.; GANGULY, N.K.; SAWHNEY, I.M.; MAHAJAN, R.C. Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. **Nepal Med. Coll. J.**, v. 7, sp. iss. 1, p.1-9, 2005.
- MANOUTCHARIAN, K.; ROSAS, G.; HERNANDEZ, M.; FRAGOSO, G.; ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; RODARTE, L.F.; SCIUTTO, E. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. **J. Parasitol.**, v. 82, sp. iss. 2, p. 250-254, 1996.
- MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clin. Immunol.**, v. 91, sp. iss. 1, p. 117-121, 1999.

- MANOUTCHARIAN, K.; DIAZ-OREA, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.; GONZALEZ, E.; DE ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GOMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO, E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 99, sp. iss. 1-2, p. 11-24, 2004.
- MAYTA, H.; TALLEY, A.; GILMAN, R.H.; JIMENEZ, J.; VERASTEGUI, M.; RUIZ, M.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, sp. iss. 1, p. 133-137, 2000.
- MAYTA, H.; HANCOCK, K.; LEVINE, M.Z.; GILMAN, R.H.; FARFAN, M.J.; VERASTEGUI, M.; LANE, W.S.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; TSANG, V.C.W. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 156, sp. iss. 2, p. 154-161, 2007.
- MEDINA-ESCUZIA, E.; MORALES-LOPEZ, Z.; PROANO, J.V.; VAZQUEZ, J.; BERMUDEZ, V.; ORTIZ-NAVARRETE, V.; MADRID-MARINA, V.; LACLETTE, J.P.; CORREA, D. Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: Lack of immune suppression. **J. Parasitol.**, v. 87, sp. iss. 3, p. 587-590, 2001.
- MEEUSEN, E.; GORRELL, M.D.; RICKARD, M.D.; BRANDON, M.R. Lymphocyte subpopulations of sheep in protective immunity to *Taenia-hydatigena*. **Parasite Immunol.**, v. 11, sp. iss. 2, p. 169-181, 1989.
- MEZA, N.W.; ROSSI, N.E.; GALEAZZI, T.N.; SANCHEZ, N.M.; COLMENARES, F.I.; MEDINA, O.D.; UZCATEGUI, N.L.; ALFONZO, N.; ARANGO, C.; URDANETA, H. Cysticercosis in chronic psychiatric inpatients from a Venezuelan community. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, sp. iss. 3, p. 504-509, 2005.
- MISHRA, B.B.; GUNDRA, U.M.; WONG, K.; TEALE, J.M. MyD88-Deficient mice exhibit decreased parasite-induced immune responses but reduced disease severity in a murine model of neurocysticercosis. **Infect. Immun.**, v. 77, sp. iss. 12, p. 5369-5379, 2009.
- MOLINARI, J.L.; TATO, P.; REYNOSO, O.A.; CAZARES, J.M.L. Depressive effect of a *Taenia-solium* cysticercus factor on cultured human-lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 84, sp. iss. 3, p. 205-208, 1990.
- MOLINARI, J.L.; TATO, P.; LARAAGUILERA, R.; WHITE, A.C. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. **J. Parasitol.**, v. 79, sp. iss. 1, p. 124-127, 1993.

- MOLINARI, J.L.; GARCIA-MENDOZA, E.; DE LA GARZA, Y.; RAMIREZ, J.A.; SOTELO, J.; TATO, P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, sp. iss. 6, p. 777-781, 2002.
- MONTERO, E.; GONZALEZ, L.M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GARATE, T. *Taenia solium* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for human cysticercosis. **J. Chromatogr. B.**, v. 786, sp. iss. 1-2, p. 255-269, 2003.
- MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cisticercoses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 320-327, 1911.
- NASH, T.E. Human case management and treatment of cysticercosis. **Acta Trop.**, v. 87, sp. iss. 1, p. 61-69, 2003.
- NATIVIG, J.B., KUNKEL, H.G. Human Immunoglobulins classes, subclasses, genetic variants and idiotypes. **Adv. Immunol.**, v.16, n.1, p.1-59, 1973.
- NETO, F.I.; PIANETTI-FILHO, G.; ARAUJO, R.N.; NASCIMENTO, E. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semi-purified scolex antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n. 2, p. 163-169, 2007.
- NICOLETTI, A.; BARTOLONI, T.; SOFIA, V.; BARTALESI, T.; CHAVEZ, J.R.; OSINAGA, R.; PARADISI, T.; DUMAS, J.L.; TSANG, V.C.W.; REGGIO, A.; HALL, A.J. Epilepsy and neurocysticercosis in rural bolivia: A population-based survey. **Epilepsia**, v. 46, sp. iss. 7, p. 1127-1132, 2005.
- NIETO, D. Cysticercosis of nervous system. Diagnosis by means of spinalfluid complement fixation test. **Neurology**, v. 6, sp. iss. 10, p. 725-738, 1956.
- NOYA, O.; PATARROYO, M.E.; GUZMAN, F.; DE NOYA, BA. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 4, sp. iss. 4, p. 299-308, 2003.
- OBREGON-HENAO, A.; GIL, D.L.; GOMEZ, D.I.; SANZON, F.; TEALE, J.M.; RESTREPO, B.I. The role of N linked carbohydrates in the antigenicity of *Taenia solium* metacestode glycoproteins of 12, 16 and 18 kD. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 114, sp. iss. 2, p. 209-215, 2001.
- OLIVO, A.; PLANCARTE, A.; FLISSER, A. Presence of antigen-B from *Taenia-solium* cysticercus in other platyhelminthes. **Int. J. Parasitol.**, England, v. 18, p. 543-545, 1988.

- OSTROSKYZEICHNER, L.; GARCIAMENDOZA, E.; RIOS, C.; SOTELO, J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. **Arch. Med. Res.**, v. 27, sp. iss. 4, p. 513-517, 1996.
- PAL, D.K.; CARPIO, A.; SANDER, J.W.A.S. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 68, sp. iss. 2, p. 137-143, 2000.
- PARDINI, A.X.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.D.R.; LIVRAMENTO, J.A. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, sp. iss. 9, p. 3368-3372, 2001.
- PARKHOUSE, R.M.; BONAY, P.; GONZÁLEZ, L.M.; FERRER, E.; GÁRATE, T.; AQUILAR, C.M.; CORTEZ, A.M.M.; HARRISON, L.J. TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen, **Parasitol. Res.**, n.102, v.5, p. 921-926, 2008.
- PERALTA, R.H.S.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.; MACEDO, H.W.; MACHADO, L.R.; DE SIMONE, S.G.; PERALTA, J.M. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Trop.**, v. 38, sp. iss. 2, p 159-168, 2002.
- PERALTA, R.H., ESPÍNDOLA, N.M., PARDINI, A.X., IHA, A.H., MOURA, H., BARR, J.R., VAZ, A.J., PERALTA, J.M. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Exp. Parasitol.**, v. 124, n.3, p. 295-300, 2010.
- PESSOA, S.B.; MARTINS, A.M. Cisticercose. In: PESSOA, S.B.; AMILCAR, V.M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1988, cap. X, p. 448-464.
- PHIRI, I.K.; NGOWI, H.; AFONSO, S.; MATENGA, E.; BOA, M.; MUKARATIRWA, S.; GITHIGIA, S.; SAIMO, M.; SIKASUNGE, C.; MAINGI, N.; LUBEGA, G.W.; KASSUKU, A.; MICHAEL, L.; SIZIYA, S.; KRECEK, R.C.; NOORMAHOMED, E.; VILHENA, M.; DORNY, P.; WILLINGHAM, A.L. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in eastern and southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. **Acta Trop.**, v. 87, sp. iss. 1, p. 13-23, 2003.
- PLANCARTE, A.; FEXAS, M.; FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Inter. J. Parasitol.**, v. 24, sp. iss. 5, p. 733-738, 1994.
- PLANCARTE, A.; HIROTA, C.; MARTINEZ-OCANA, J.; MENDOZA-HERNANDEZ, G.; ZENTERO, E.; FLISSER, A. Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. **Parasitol. Res.**, v. 85, sp. iss. 8-9, p. 680-684, 1999.

- PRASAD, K.N.; PRASAD, A.; VERMA, A.; SINGH, A.K. Human cysticercosis and Indian scenario: a review. **J. Biosci.**, v. 33, sp. iss. 4-SI, p. 571-82, 2008.
- RAHALKAR, M.D.; SHETTY, D.D.; KELKAR, A.B.; KELKAR, A.A.; KINARE, A.S.; AMBARDEKAR, S.T. The many faces of cysticercosis. **Clin. Radiol.**, v. 55, sp. iss. 9, p. 668-674, 2000.
- RAJSHEKHAR, V.; JOSHI, D.D.; DOANH, N.Q.; VAN DE, N.; ZHOU, X.N. *Taenia solium* cysticercosis: epidemiology and impact in Asia. **Acta Trop.**, v. 87, sp. iss. 1, p. 53-60, 2003.
- RAJSHEKHAR, V.; RAGHAVA, V.; PRABHAKARAN, V.; OOMMEN, A.; MULIYIL, J. Active epilepsy as an index of burden of neurocysticercosis in Vellore district, India. **Neurology**, v. 67, sp. iss. 12, p. 2135-2139, 2006.
- RAMIREZ-BON, E.; MERCHANT, M.T.; GONZALEZ-DELPIEGO, M.; CANEDO, L. Ultrastructure of the bladder wall of metacestode of *Taenia solium*. In: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J.P.; RIDAURA, C.; BELTRAN, F. **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. New York: Academic Press, 1982., p. 1-7.
- RAMOS JR, A.N.; MACEDO, H.W.; RODRIGUES, M.C.; PERALTA, R.H.S; MACEDO, N.A.; MARQUES, M.C.; ALVES, J.R.; PAES, A.N.; CASTRO, J.A.F.; ARAUJO, A.J.G.; PERALTA, J.M. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em um município do Estado do Piauí, Região Nordeste do Brasil. **Cad. Saude Publica**, v.20, n. 6, p. 1545-1555, 2004.
- RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10 DE OUTUBRO DE 1996. III - Aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/1996/Reso196.doc>. Acesso em: 4 outubro 2010.
- RESTREPO, B.I.; LLAGUNO, P.; SANDOVAL, M.A.; ENCISO, J.A.; TEALE, J.M. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. **J. Neuroimmunol.**, Netherlands, v. 89, sp. iss. 1-2, p.64-72, 1998.
- RESTREPO, B.I.; OBREGON-HENAO, A.; MESA, M.; GIL, D.L.; ORTIZ, B.L.; MEJIA, J.S.; VILLOTA, G.E.; SANZON, F.; TEALE, J.M. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. **Inter. J. Parasit.**, v. 30, sp. iss. 6, p. 689-696, 2000.
- RESTREPO, B.I.; AGUILAR, M.I.; MELBY, P.C.; TEALE, J.M. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, sp. iss. 4, p. 366-370, 2001a.

- RESTREPO, B.I.; ALVAREZ, J.I.; CASTANO, J.A.; ARIAS, L.F.; RESTREPO, M.; TRUJILLO, J.; COLEGIAL, C.H.; TEALE, J.M. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. **Infect. Immun.**, v. 69, sp. iss. 7, p. 4554-4560, 2001b.
- REY, L. Cisticercose humana. In:____. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**.3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. cap. 39, p.510-519.
- ROBINSON, P.; ATMAR, R.L.; LEWIS, D.E.; WHITE, A.C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. **Infect. Immun.**, v. 65, sp. iss. 7, p. 2925-2931, 1997.
- ROBLES, Y.; GONZALEZ, E.; GOVEZENSKY, T.; MUNGLIA, M.E.; ACERO, G.; BOBES, R.J.; GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K. Isolation of the *Taenia crassiceps* antigens from a phage display cDNA library and evaluation on their use for diagnosis of neurocysticercosis. **Clin. Immunol.**, v. 116, sp. iss.3, p. 265-270, 2005.
- RODRIGUEZCANUL, R.; ALLAN, J.C.; FLETES, C.; SUTISNA, I.P.; KAPTI, I.N.; CRAIG, P.S. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 4, sp. iss. 5, p. 579-582, 1997.
- ROLFS, A.; MUHLSCHLEGEL, F.; JANSEN-ROSSECK, R.; MARTINS, A.R.; BEDAQUE, E.A.; TAMBURUS, W.M.; PEDRETTI, L.; SCHULTE, G.; FELDMEIER, H.; KREMSNER, P. Clinical and immunologic follow-up study of patients with neurocysticercosis after treatment with praziquantel. **Neurology**, v. 45, p. 532-538, 1995.
- SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K.; SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 307, p.249-264, 2008.
- SAKO, Y.; NAKAO, M.; IKEJIMA, T.; PIAO, X.Z.; NAKAYA, K.; ITO, A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, sp. iss. 12, p. 4439-4444, 2000.
- SARTI, E.; SCHANTZ, P.M.; PLANCARTE, A.; WILSON, M.; GUTIERREZ, O.I.; AGUILERA, J.; ROBERTS, J.; FLISSER, A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 88, sp. iss. 1, p. 49-52, 1994.
- SARTI-GUTIERREZ, E.J.; SCHANTZ, P.M.; LARA-AGUILERA, R.; GOMEZ DANDOY, H.; FLISSER, A. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. **Trop. Med. Parasitol.**, v. 39, sp. iss. 3, p.194-198,1988.

- SATO, M.O.; CAVALCANTE, T.V.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; YATSUDA, A.P.; NAKAYA, K.; ITO, A. Evidence and potential for transmission of human and swine *Taenia solium* cysticercosis in the Piracuruca region, Piauí, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 75, sp. iss. 5, p. 933-935, 2006.
- SATO, M.O.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; ITO, A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. **J. Infect. Dis.**, v. 194, sp. iss. 12, p. 1783-1790, 2006.
- SCHANTZ, P.M.; MOORE, A.C.; MUÑOZ, J.L.; HARTMAN, B.J.; SCHAEFER, J.A.; ARON, A.M.; PERSAUD, D.; SARTI, E.; WILSON, M.; FLISSER, A.N. Neurocysticercosis in an orthodox jewish community in New York City. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, p. 692-695, 1992.
- SCHANTZ, P.M.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAWLOWSKI, Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bull. Pan. Am. Health Organ.**, United States, v. 27, sp. iss. 4, p.397-403, 1993.
- SCHANTZ, P.M.; WILKINS, P.P.; TSANG, V.C.W. *Taenia solium* cysticercosis as an imported disease. In: GARCIA, H.H.; MARTINEZ, S.M. **Taenia solium Taeniasis/cysticercosis**. Lima: Éd. Universo, 1999. cap. X, p. 264-272.
- SCHWAN, E.V.; DE SCALLY, M.P.; VAN RENSBURG, C.L.; DURAND, D.T. Cerebral cysticercosis in a cat. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 73, sp. iss. 4, p. 219-221, 2002.
- SHEFFIELD, P.; GARRARD, S.; DEREWENDA, Z.. Overcoming Expression and Purification Problems of RhoGDI Using a Family of "Parallel" Expression Vectors. **Protein Expr. Purif.**, v. 15, sp. iss. 1, p. 34-39, 1999.
- SHUKLA, N.; HUSAIN, N.; JYOTSNA; GUPTA, S.; HUSAIN, M. Comparisons between scolex and membrane antigens of *Cysticercus fasciolaris* and *Cysticercus cellulosae* larvae for immunodiagnosis of neurocysticercosis. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 41, p. 519-524, 2008.
- SILVA, M.R.; MAIA, A.A.; ESPÍNDOLA, N.M.; MACHADO, L.DOS.R.; VAZ, A.J.; HENRIQUE-SILVA, F. Recombinant expression of *Taenia solium* TS14 antigen and its utilization for immunodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Trop.**, v. 100, sp. iss. 3, p. 192-198, 2006.
- SILVA-VERGARA, M.L.; PRATA, A.; VIEIRA, C.DE.O.; CASTRO, J.H.; MICHELETTI, L.G.; OTAÑO, A.S.; FRANQUINI JUNIOR, J. The epidemiological aspects of taeniasis-cysticercosis in an endemic area of Lagamar, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 28, n. 4, p. 345-349, 1995.

- SIMANJUNTAK, G.M.; MARGONO, S.S.; SCHLAN, R.; HARJONO, C.; RASIDI, R.; SUTOPO, B.. An investigation on taeniasis and cysticercosis in Bali. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 8, sp. iss. 4, p. 494-497, 1977.
- SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v.115, p.113-128, 2005.
- SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; BACHESCHI, L.A.; GARCÍA-LOPES, P. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in cysticercosis of the central nervous system. **Neurol. Neurocir. Psiquiatr.**, v. 18, sp. suppl. 2-3, p. 413-420, 1977.
- TAKAYANAGUI, O.M.; JARDIM, E. Clinical aspects of neurocysticercosis:analysis of 500 cases. **Arq. Neuropsiquiatr.**; v. 41, n. 1, p. 50-63, 1983.
- TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Neurocisticercose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 3, p. 283-290, 2001.
- TAKAYANAGUI, O.M.; ODASHIMA, N.S. Clinical aspects of neurocysticercosis. **Parasitol. Int.**, v. 55, sp. iss. S, p. S111-S115, 2006.
- TATO, P.; CASTRO, A.M.; RODRIGUEZ, D.; SOTO, R.; ARECHAVALETA, F.; MOLINARI, J.L. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. **Parasitol. Res.**, v. 81, sp. iss. 3, p. 181-1987, 1995.
- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biot.**, v. 72, sp. iss. 2, p. 211-222, 2006.
- 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.**, v. 55, sp. iss. 4, p. 456-458, 1996.
- THUSSU, A.; SEHGAL, S.; SHARMA, M.; LAL, V.; SAWHNEY, I.M.; PRABHAKAR, S. Comparison of cellular responses in single- and multiple-lesion neurocysticercosis. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v. 91, sp. iss. 6, p. 627-632, 1997.
- TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **J. Infect. Dis.**, v. 159, sp. iss. 1, p. 50-59, 1989.
- VAZ, A.J.; LIVRAMENTO, J.A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W. & AVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. cap. 31, p. 316-322.

- VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; FERREIRA, A.W. Dot-ELISA for the detection of anti-*Cysticercus cellulosae* antibodies in cerebrospinal fluid using a new solid phase (resin-treated polyester fabric) and *Cysticercus longicollis* antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, n. 6, p. 391-396, 1996.
- VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; DASILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 57, sp. iss. 3, p. 354-357, 1997.
- WALDO, G.S.; STANDISH, B.M.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T.C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, sp. iss. 7, p. 691-695, 1999.
- WANDRA, T.; DEPARY, A.A.; SUTISNA, P.; MARGONO, S.S.; SUROSO, T.; OKAMOTO, M.; CRAIG, P.S.; ITO, A. Taeniasis and cysticercosis in Bali and North Sumatra, Indonesia. **Parasitol. Int.**, v. 55, p. S155-S160, 2006.
- WANG, I.C.; FAN, P.C.; LU, S.C.; FAN, C.K.; SU, K.E. Suppression of host Th1-type granulomatous inflammation by *Taenia solium* metacestodes is related to down-regulation of osteopontin gene expression. **Int. J. Parasit.**, v. 38, sp. iss. 2, p. 239-248, 2008.
- WHITE, A.C. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, sp. iss. 2, p. 101-115, 1997.
- WHITE, A.C. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Ann. Rev. Med.**, v. 51, p. 187-206, 2000.
- WILSON, M.; BRYAN, R.T.; FRIED, J.A.; WARE, D.A.; SCHANTZ, P.M.; PILCHER, J.B.; TSANG, V.C.W. Clinical-evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **J. Infect. Dis.**, v. 164, sp. iss. 5, p. 1007-1009, 1991.
- ZAR, J.H. Statistical Procedures for Biological Research. In:____. **Biostatistical analysis**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. cap. [s.n.], p. 20-20.
- ZARLENGA, D.S.; RHOADS, M.L.; ALYAMAN, F.M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 67, sp. iss. 2, p. 215-223, 1994.
- ZOLI, A.; SHEY-NJILA, O.; ASSANA, E.; NGUEKAM, J.P.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in western and central Africa. **Acta Trop.**, v. 87, sp. iss. 1, p. 35-42, 2003.

ZURABIAN, R., CARRERO, J.C., RODRÍGUEZ-CONTREAS, D., WILLMS, K., LACLETTE, J.P. Antigenic proteins associated with calcareous corpuscles or *Taenia solium* partial characterization of a calcium-binding protein. **Ach Med. Res.**, v. 36, n.1, p.4-9, 2005.

ANEXOS

ANEXO I. Soluções e Reagentes.....	115
ANEXO II. Aval do Comitê de Ética.....	121
ANEXO III. Ficha do Aluno.....	122
ANEXO IV. Currículo Lattes.....	124

ANEXO I - SOLUÇÕES E REAGENTES

I. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose

TAE: 40 mM Tris-acetato , 1 mM EDTA pH 8,0 (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

Gel de agarose: 1,5% agarose (Invitrogen, Carlsbad, EUA), TAE, 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

Tampão de amostra para eletroforese de DNA (5X): 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno-cianol (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), 30% Glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha)

II. Soluções para extração de DNA por lise alcalina

Solução A: 50 mM glicose (Invitrogen, Carlsbad, EUA) , 25 mM Tris-HCl/pH 8,0 (Research Organics, Cleveland, EUA) e 10 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução B: 0,2M NaOH (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 1% SDS (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução C: 3 M acetato de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 5 M ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha)

III. Meios de cultura para bactérias

LB (Luria Bertani): 2% LB broth base (Gibco, Auckland, Nova Zelândia), 0,5% NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) pH 7,0

SOB: 2% triptone (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), 0,5% extrato de levedura (Difco, Detroit, EUA) e 0,5% NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH 7,0

SOC: SOB, 10 mM MgCl_2 (Merck, Darmstadt, Alemanha), 20 mM Glicose (Gibco, Grand Island, EUA)

IV. Tampões utilizados para a purificação das proteínas recombinantes

Tampão de Lise: 20mM Tris-HCl [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,0 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) , 200mM NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha) ; 2mM PMSF (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de lisozima (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), 1% de Triton (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Purificação em coluna

Tampão de equilíbrio: 20 mM Tris-HCl [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,0 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 5mM Imidazol(USB, Cleverland, EUA), Triton 1%(Merck, Darmstadt, Alemanha).

Tampão de lavagem: 20 mM Tris-HCl [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,0 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2mM PMSF (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA)

Tampão de eluição: 20 mM Tris-HCl [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,0 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Alemanha), 15 a 400 mM Imidazol (USB, Cleverland, EUA).

V. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%)

Gel de corrida: 30% acrilamida (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), 0,8% bis-acrilamida (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha), 0,75 M Tris (USB, Cleveland, EUA), 0,2% SDS pH 8,8 (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 0,1% persulfato de amônio (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), Temed 12 μL (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

Gel de separação: 12% acrilamida (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), 1,2% bis-acrilamida (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha), 0,25 M Tris (USB, Cleveland, EUA), 0,2% SDS pH 6,8 (USB Corporation, Cleveland, EUA), 0,1% persulfato de amônio (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), Temed 10 µL (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

Solução tampão de amostra 5 vezes concentrado: [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 6,8 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha)], SDS 2% (USB Corporation, Cleveland, EUA), glicerol 25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 2-mercaptoetanol 0,014M (Sigma, St. Louis, EUA), e azul de bromofenol 0,1% (Sigma, St. Louis, EUA) em água destilada.

Tampão de corrida: 35 mM SDS (USB Corporation, Cleveland, EUA), 160 mM glicina (USB Corporation, Cleveland, EUA), 25 mM Tris-HCl [Tris 1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,3 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha)]

VI. Solução para coloração de Gel SDS

Coomassie *Blue*

Solução corante: 1% Coomassie *Blue* R250 (USB Corporation, Cleveland, EUA), 45% Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), 10% ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução descorante: 45% Etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), 10% ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha)

VII. Para Transferência Eletroforética

Solução tamponada de transferência pH 8,3: Tris 0,025M (USB Co.), glicina 0,192 M (USB Corporation, Cleveland, EUA) e metanol 20% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.

Solução corante Ponceau: Ponceau-S 0,5% (USB Corporation, Cleveland, EUA) em ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10%.

VIII. Soluções e tampões para Immunoblot utilizando anticorpo anti- histidina

Tampão de transferência: 192 mM Glicina (USB Corporation, Cleveland, EUA), 25 mM Tris (USB Corporation, Cleveland, EUA), 20% Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução de revelação: Solução cromógena 4-cloro-naftol: 4-cloro-naftol 0,05% (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) em tris-salina tamponada pH7,4 0,01M (Tris 0,01M e NaCl 0,15M) com metanol 16,6% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e H₂O₂ 0,6% (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução salina tamponada com fosfatos 0,01M pH 7,2 (PBS): Na₂HPO₄ 0,0075M (Merck, Darmstadt, Alemanha) NaH₂PO 0,025M (Merck, Darmstadt, Alemanha) e NaCl 0,14M (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.

PBS-T: PBS com 0,05% Tween 20 (USB Corporation, Cleveland, EUA).

IX. Para Immunoblot utilizando amostras de soro e LCR

Solução de lavagem: PBS-T

Tampão de bloqueio e diluente da amostra: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS-T

Tampão diluente da amostra: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 1% em PBS-T

Tampão diluente de substrato 4-cloro-naftol: Tris-HCl [Tris 0,1M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça) ajustado para pH 8,0 com HCl (Merck, Darmstadt, Alemanha)]

Solução cromógena 4-cloro-naftol: 4-cloro-naftol 0,05% (Sigma Chem. Co., St. Louis, EUA) em Tris- Salina [Tris 0,06M (Amersham Biosciences, Uppsala, Suíça), NaCl 15M (Merck, Darmstadt, Alemanha)] com metanol 16,6% (Merck, Darmstadt, Alemanha) e H_2O_2 0,6% (Merck, Darmstadt, Alemanha)

Solução Cromógena de 3,3 – diaminobenzidina: diaminobenzidina 0,017% (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) e H_2O_2 5% (Merck, Darmstadt, Alemanha) em PBS pH 7,2.

X. ELISA

Solução tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6: Na_2CO_3 0,1M (Merck, Darmstadt, Alemanha) e NaHCO_3 0,1M (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água destilada.

Solução de lavagem: PBS –T

Solução bloqueadora e solução diluente: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 5% em PBS-T

Solução diluente para pesquisa de Isótipos de IgG: solução de leite (leite desnatado Molico, Nestlé, Araçatuba, São Paulo, Brasil) a 1% em PBS-T

Solução cromógena OPD (Sigma Chem. Co.): 1 pastilha de OPD (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), em 50 mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 1 μL de H_2O_2 (Merck, Darmstadt, Alemanha) por mL de solução cromógena

Tampão citrato fosfato pH 5,0: fosfato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,132M, ácido cítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) 0,022M em água destilada.

XI. Meio para cultura celular

RPMI completo: RPMI (Gibco, Auckland, Nova Zelândia), HEPES 10mM (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), gentamicina 100U.mL⁻¹ (USB, Cleveland, EUA), L- Glutamina 2mM (Gibco, Grand Island, EUA), aminoácidos não essenciais 1% (Gibco, Grand Island, EUA), piruvato de sódio 1mM (Gibco, Grand Island, EUA),

mercaptoetanol 0,05mM (Sigma, St. Louis, EUA), adicionar somente no momento do uso
human serum AB (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA) a 10%

ANEXO II. AVAL DO COMITÊ DE ÉTICA **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**Ofício CEP nº 52 /2008

São Paulo, 01 de julho de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).
Andréia Bartachini Gomes
Orientador Prof. Adelaide José Vaz
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de junho de 2008, **APROVOU** o projeto "Obtenção de proteínas recombinantes baseadas em antígenos do líquido vesicular de 'Taenia crassiceps': aplicação no diagnóstico sorológico da neurocisticercose" (Protocolo CEP nº 468) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO III. FICHA DO ALUNO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5080232/2 - Andréia Bartachini Gomes

Email: abgomes@usp.br
Data de Nascimento: 26/12/1978
Cédula de Identidade: RG - 26.891.367-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2003
Mestrado: Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 05/02/2007
Início da Contagem de Prazo: 05/02/2007
Data Limite: 05/02/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Adelaide Jose Vaz - 05/02/2007 até o presente. E.Mail: ajvaz@usp.br
Coorientador: Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 13/12/2007 até o presente. E.Mail: isoares@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 07/07/2010
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 05/02/2007
 Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2010

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2010

Impresso em: 11/11/10 19:45:02

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5080232/2 - Andréia Bartachini Gomes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5748 - 1/3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	01/03/2007	10/05/2007	60	4	100	A	N	Concluída
BMP5735 - 5/4	Seminários em Parasitologia I	02/03/2007	22/06/2007	30	2	85	A	N	Concluída
FBC5757 - 1/2	Seminários em Análises Clínicas II	06/08/2007	18/11/2007	30	2	85	A	N	Concluída
EDM5044 - 2/1	Ensinando em Ambientes Virtuais I (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2008	02/06/2008	120	8	100	A	N	Concluída
BTC5743 - 1/9	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	12/03/2008	24/06/2008	30	2	100	A	N	Concluída
BMP5761 - 4/7	Seminários em Parasitologia II	08/08/2008	21/11/2008	30	2	95	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	20
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2010

Impresso em: 11/11/10 19:45:02

ANEXO IV. CURRÍCULO LATTES

Andreia Bartachini Gomes

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Andreia Bartachini Gomes

Nome em citações bibliográficas GOMES, A. B.

Sexo feminino

Filiação José Augusto Fernandes Gomes e Janice Bartachini Gomes

Nascimento 26/12/1978 - Guarulhos/SP - Brasil

Carteira de Identidade 268913675 SSP - SP - 14/12/1990

CPF 27810387847

Endereço residencial Rua Ciro Costa, 49 apartamento 54

Perdizes - São Paulo

05007-060, SP - Brasil

Telefone: 011 36724933

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Avenida Lineu Prestes, 580

Butantã - São Paulo

05508-900, SP - Brasil

Telefone: 011 30913662

Endereço eletrônico

e-mail para contato : abartachinig@yahoo.com.br

e-mail alternativo : abartachinig@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007** Doutorado em Imunologia Clínica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Obtenção e aplicação de proteínas recombinantes baseadas em antígenos do líquido vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no diagnóstico sorológico da neurocisticercose
Orientador: Professora Doutora Adelaide José Vaz
Palavras-chave: Anticorpo, ELISA, Immunoblot, antígeno recombinante
- 2004 - 2006** Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Imunoensaios para triagem da cisticercose suína em animais com baixa carga parasitária, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Adelaide José Vaz
Palavras-chave: Anticorpo, Antígeno, ELISA, Immunoblot
Áreas do conhecimento : Farmácia
Setores de atividade : Educação Superior
- 2003 - 2004** Especialização em Imunologia Clínica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
- 1997 - 2002** Graduação em Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdades Oswaldo Cruz - FOC

Vínculo institucional

2006 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Docente , Carga horária: 6,

Regime: Parcial

Outras informações:

Atuação como docente na disciplina de Imunologia Básica do curso de Farmácia e Bioquímica.

2004 - 2006

Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Docente , Carga horária: 6,
Regime: Parcial

Outras informações:

Docente da disciplina de Parasitologia, auxiliando nas aulas práticas do curso de farmácia e bioquímica.

2003 - Atual

Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Docente , Carga horária: 6,
Regime: Parcial

Outras informações:

Docente da disciplina de Citologia, Histologia e Embriologia; auxiliando nas aulas práticas para o curso de farmácia e bioquímica.

Atividades

11/2006 - Atual

Especialização

Especificação:

Parasitologia Clínica, Imunologia Clínica

10/2005 - 12/2005

Especialização

Especificação:

Imunologia e Parasitologia Clínica

10/2004 - 12/2004

Especialização

Especificação:

Imunologia e Parasitologia Clínica

03/2003 - Atual

Graduação, Farmácia e Bioquímica

Disciplinas Ministradas:

Imunologia Básica, Histologia, Citologia e Embriologia

2. Universidade Anhembi Morumbi - UAM

Vínculo institucional

2007 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Docente, Carga horária: 16,
Regime: Parcial

Outras informações:

Atuação como docente na disciplina Agressão e Defesa, Diagnóstico Laboratorial das Doenças Infecciosas e Parasitárias e Interpretação Clínica de Exames Laboratoriais. Responsável técnica pelo desenvolvimento do Projeto de Combate à Verminose Infantil, que objetiva o diagnóstico e encaminhamento de tratamento de parasitoses, bem como a divulgação de medidas de profilaxia e saneamento básico.

3. Universidade São Judas Tadeu - USJT

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista formal, Enquadramento funcional: Docente, Carga horária: 9, Regime: Parcial

Outras informações:

Atuação como docente nas disciplinas de microbiologia e bioquímica para o curso de Farmácia e Bioquímica, abrangendo os conceitos teóricos e práticos da área de microbiologia e as análises laboratoriais na área de bioquímica básica.

4. Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Vínculo institucional

2004 - 2004

Vínculo: Professor visitante, Enquadramento funcional: Professor visitante, Regime: Integral

Atividades

12/2004 - 12/2004

Especialização

Especificação:

Tópicos Avançados em Imunologia

12/2003 - 12/2003

Especialização

Especificação:

5. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP**Vínculo institucional****2005 - 2005**

Vínculo: Professor visitante, Enquadramento funcional: Professor visitante, Regime: Integral

Atividades**02/2005 - 02/2005** Especialização*Especificação:**Imunologia Clínica***6. Universidade de Guarulhos - UNG****Vínculo institucional****2003 - 2003**

Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Professor, Regime: Integral

Atividades**02/2003 - 05/2003** Especialização*Especificação:**Imunologia Clínica e Ocupacional***7. Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP****Vínculo institucional****2004 - 2004**

Vínculo: Professor visitante, Enquadramento funcional: Professor visitante, Regime: Integral

Atividades**10/2004 - 10/2004** Especialização*Especificação:**Tópicos Avançados em Imunologia Clínica***Áreas de atuação**

1. Farmácia
2. Imunologia
3. Microbiologia
4. Parasitologia

Idiomas**Inglês**

Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos**2003**

Menção Honrosa no I Curso de Capacitação de Docentes e Pesquisadores na Manipulação e Descarte de Organismos Geneticamente Modificados, Universidade de São Paulo - SP

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. GOMES, A. B., A.S., EC, Espíndola, N.M., IHA, A. H., Maia, A.M.M., Peralta, R.H.S., Vaz, A.J. Comparative evaluation of different immunoassays for the detection of *Taenia solium* cysticercosis in swine with low parasite burden. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* , v.102, p.725 - 731, 2007.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. GOMES, A. B., Espíndola, N.M., IHA, A. H., Maia, A.M.M., Peralta, R.H.S., Vaz, A.J. Aplicação de Imunoensaios para a Triagem da Cisticercose em Suínos In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.

XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. FARIAS, C.R., GOMES, A. B., IHA, A. H., Espíndola, N.M., Vaz, A.J. Potencial Aplicação de Peptídeos Sintéticos selecionados a partir de Seqüências de Aminoácidos de *Taenia crassiceps* e Homólogas às de *Taenia solium* para o diagnóstico da Cisticercose In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.

XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. , 2006.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

3. GOMES, A. B., Espíndola, N.M., IHA, A. H., Maia, A.M.M., Sanchez, M.C.A., Peralta, J.M., Peralta, R.H.S., Vaz, A.J.

Determinação de Anticorpos em Soro de Suínos portadores de Cisticercose In: XX Seminário de Pós-Graduação - USP, 2005, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2005. v.41.

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. GOMES, A. B., Espíndola, N.M., Jimenez, M.C.S., Soares, I.S., Vaz, A.J. Obtenção de uma Proteína Recombinante correspondente ao Antígeno de 14 kDa do cisticerco de *Taenia crassiceps* (Tc 14) In: XX Seminário de Pós-Graduação - USP, 2005, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2005. v.41.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

5. GOMES, A. B., IHA, A. H., Espíndola, N.M., Maia, A.M.M., Vaz, A.J. Padronização de Testes Imunológicos para a Pesquisa de Antígenos Circulantes em Soro de Suínos Portadores de Cisticercose In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia -USP, 2004, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2004. v.40.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

6. GOMES, A. B., IHA, A. H., OLIVEIRA, E. J. Medidas de Biossegurança na Produção de Anticorpos Monoclonais utilizando a Técnica de Hibridização Somática In: I Curso de Capacitação de Docentes e Pesquisadores na Manipulação e Descarte de Organismos Geneticamente Modificados, 2003, São Paulo.

Caderno de Resumos do I Curso de Capacitação de Docentes e Pesquisadores na Manipulação e Descarte de Organismos Geneticamente Modificados. , 2003.

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7. GOMES, A. B., LAJOLO, F.M., Nascimento, J.R.O. Obtenção da sequência completa de cDNA da sacarose-fosfato sintase de banana por PCR In: Semana Farmacêutica da Universidade de São Paulo - VIII Reunião Científica, 2000, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2000. v.36.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8. GOMES, A. B., LAJOLO, F.M., Nascimento, J.R.O.

Obtenção da sequência completa de cDNA da sacarose-fosfato sintase de banana por PCR In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2000, Ribeirão Preto.

Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. , 2000.

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de Trabalho

1. GOMES, A. B., Espíndola, N.M., Soares, I.S., Vaz, A.J.

Utilização de Antígeno Recombinantes de Taenia crassiceps em imunoblot para pesquisa de anticorpos IgG em soro de pacientes com neurocisticercose, 2008. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Evento: XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. GOMES, A. B.

Módulo de Imunofarmacologia, 2008. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. 3 dias. Meio de divulgação: Impresso

Orientações e Supervisões

Orientações e Supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Santos, L.G., Zambelli, A., Almeida, C.S., Picolo, C.P., Ramaglio, N. **O papilomavírus humano, seu diagnóstico e a importância da vacina quadrivalente contra os tipos 6, 11, 16 e 18**. 2010. Curso (Farmácia) - Universidade Anhembi Morumbi

Palavras-chave: HPV, neoplasia, vacina quadrivalente, condiloma, diagnóstico

Áreas do conhecimento : ANÁLISES CLÍNICAS, Imunologia

Referências adicionais : Brasil/Português.

Eventos

Participação em eventos

1. **II Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2010. (Simpósio)

2. Apresentação Oral no(a) **Disciplina de Tópicos Avançados sobre Imunoquímica de Antígenos (FBC5717)**, 2009. (Outra)

Antígenos Parasitários Recombinantes.

3. Apresentação Oral no(a) **I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia- Área de Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)

Obtenção e caracterização de moléculas recombinantes com potencial utilidade no imunodiagnóstico da cisticercose.

4. **III Semana Acadêmica**, 2009. (Oficina)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2008. (Seminário)

Utilização de Antígeno Recombinante de Taenia crassiceps em imunoblot para pesquisa de anticorpos IgG em soro de pacientes com Neurocisticercose.

6. **Treinamento em Morfologia Digital**, 2008. (Oficina)

7. **Treinamento em Metodologias Ativas**, 2008. (Outra)

8. **Treinamento em Biologia Molecular**, 2008. (Outra)

9. **O Ensino Baseado em Problemas**, 2008. (Outra)

10. **Semana de Planejamento de Atividades Acadêmicas UAM**, 2008. (Encontro)

11. Apresentação de Poster / Painel no (a) **XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2006.

(Outra)

Aplicação de Imunoensaios para Triagem da Cisticercose em Suínos.

12. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2005. (Congresso)

Desenvolvimento e Padronização de Testes Imunológicos para a Pesquisa de Antígenos Circulantes de cisticercos de *Taenia solium* em soro de suínos portadores de cisticercose.

13. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **XX Seminário de Pós-Graduação**, 2005. (Seminário)

Determinação de Anticorpos em Soro de Suínos portadores de Cisticercose.

14. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2004. (Encontro)

Padronização de Testes Imunológicos para a Pesquisa de Antígenos Circulantes em Soro de Suínos portadores de Cisticercos.

15. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **IV Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2003. (Simpósio)

IV Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa.

Áreas do conhecimento : Farmácia

16. Apresentação de Pôster / Paineis no (a) **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2000. (Simpósio)

Obtenção da seqüência completa de cDNA da sacarose – fosfato sintase de banana por PCR.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. GOMES, A. B.

Participação em banca de Paulo Ferreira da Silva. **Projeto de Assistência Farmacêutica para a Prevenção de Verminose Infantil**, 2007

Universidade Anhembi Morumbi

Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	8
Apresentações de Trabalhos (Seminário).....	1

Produção Técnica

Curso de curta duração ministrado (outro).....	1
--	---

Orientações

Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	1
Participações em eventos (seminário).....	2
Participações em eventos (simpósio).....	4
Participações em eventos (oficina).....	2
Participações em eventos (encontro).....	2
Participações em eventos (outra).....	5
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1