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

Peptídeos sintéticos selecionados a partir de seqüências de
aminoácidos de *Taenia crassiceps* e homólogas às de
Taenia solium com potencial aplicação no diagnóstico da
cisticercose

Cristiane Rocha de Farias

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2006

Cristiane Rocha de Farias

Peptídeos sintéticos selecionados a partir de seqüências de
aminoácidos de *Taenia crassiceps* e homólogas às de
Taenia solium com potencial aplicação no diagnóstico da
cisticercose

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de
MESTRE em Farmácia

Área de concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Prof Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2006

Cristiane Rocha de Farias

Peptídeos sintéticos selecionados a partir de seqüências de aminoácidos de *Taenia crassiceps* e homólogas às de *Taenia solium* com potencial aplicação no diagnóstico da cisticercose

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Adelaide José Vaz
orientadora/presidente

Prof. Dr. José Antônio Livramento

Profa Dra Kioko Takei

São Paulo, 07 de novembro de 2006.

A Deus, meus pais e amigos.

A **Deus**, que é o criador de todas as coisas e que nada acontece se não for de Sua vontade.

A meus pais, **Edileusa e Nivaldo**, que me ensinaram a importância do estudo, como sendo o único caminho que nos faz alcançar nossos objetivos com dignidade e fazer a diferença na construção de um mundo melhor.

A meu namorado, **Everton**, pela paciência e carinho...

À minha orientadora, **Profa Dra Adelaide José Vaz**, que será sempre um espelho de virtudes, simplicidade, competência e profissionalismo. Minha eterna gratidão, por todas às oportunidades, ensinamentos e conselhos.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Livramento, Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado**, e **Prof Dr Osvaldo Massaiti Takayanagui** por encaminhar as amostras de soros humanos de pacientes com neurocisticercose ao Laboratório de Imunologia Clínica – USP, tornando possível a realização deste trabalho.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

À **Profa Dra Kioko Takei**, pela troca constante de conhecimentos e companheirismo.

Ao **Laboratório de Análises Clínicas (LAC)** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP pela coleta das amostras de soros de indivíduos supostamente saudáveis para o Laboratório de Imunologia Clínica – USP.

À **equipe “cisticercótica”**: Alberto, Alê, Déia, Edward, Faby, Fabi Érica, Elói, Nô, e Rosa que são além de amigos....são irmãos do coração

A meus **futuros alunos**, por me fazer reconhecer, desde já, a importância do estudo contínuo de um professor para a orientação de seus alunos.

A meus **amigos**, que compreendem que a verdadeira amizade supera a distância e a saudade, mas, prontamente, apenas com um olhar ou uma palavra, sabem o que sinto em meu coração...

A todos aqueles que me impulsionaram profissionalmente e pessoalmente, meus sinceros agradecimentos.

“Feliz aquele que teme ao Senhor e anda em teus caminhos:
Comerás do fruto de tuas mãos, serás feliz e prosperarás.”
Salmos 128:1-2

FARIAS, C.R. **Peptídeos sintéticos selecionados a partir de seqüências de aminoácidos de *Taenia crassiceps* e homólogas às de *Taenia solium* com potencial aplicação no diagnóstico da cisticercose.** 2006. 114 p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A utilização de antígenos de *Taenia crassiceps* vem se mostrando como via alternativa no imunodiagnóstico da neurocisticercose (NC), sendo as frações de 18 e 14 kDa consideradas específicas. No presente trabalho, foram sintetizados seis peptídeos, com base nas seqüências de aminoácidos das proteínas de 10, 14 e 18 kDa de *T. crassiceps* e homólogas às seqüências de aminoácidos de *T. solium*. Os peptídeos foram divididos em “a” e “b”, denominados como, P1a, P2a, P3a e P4a e P1b, P3b e P4b, sendo, as seqüências de aminoácidos dos peptídeos “a”, uma seqüência interna dos peptídeos “b”. Em estudo da antigenicidade dos peptídeos conduzido por teste ELISA, P1a e P4a isolados ou utilizados como múltiplos peptídeos antigênicos (MAP) contendo dois, três ou quatro peptídeos, apresentaram reatividade com soro hiperimune anti-líquido vesicular de *T. crassiceps*, enquanto que MAPs contendo apenas P2a e P3a não foram antigênicos. Anticorpos monoclonais (AcMos) anti-*T. crassiceps* (n=3) e anti-*T. solium* (n=19), reconheceram, em ordem decrescente, P1b (72,7%), P1a (45,5%) e P3a e P2a (9,1%), enquanto que P3b, P4a e P4b não apresentaram reatividade com os AcMos utilizados. Com soros humanos de pacientes com NC (NC) e de indivíduos supostamente saudáveis (ISS), P1b e P1a foram considerados potencialmente antigênicos, isolados ou em MAPs com três ou quatro peptídeos. A avaliação do teste ELISA com peptídeo sintético isolado ou MAP, respectivamente, P1b e MAP-a

(P1a+P3a+P4a), foi realizada baseando-se em três diferentes *cut off*, a, b e TG-ROC. De acordo com os *cut off* utilizados, ELISA com P1b apresentou índices de positividade entre 59,0-79,5% com amostras de soros NC (n=39); 1,3-11,8% com ISS (n=76); 3,4-10,2% com amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul (H-R) (n=59); 0,0-50,0% com amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru (H-P) (n=8) e 0,0-9,1% com amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (OP) (n=33). ELISA com MAP-a apresentou índices de positividade entre 57,7-92,3% com NC (n=26); 1,4-9,6% com ISS (n=73); 0,0-13,3% com H-R (n=15) e 12,5-37,5% com H-P (n=8). Na tentativa de aumentar a positividade do teste ELISA com peptídeos sintéticos, antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* foi adicionado, porém, não houve maior antigenicidade ao complexo antigênico. Os peptídeos sintéticos utilizados mostraram-se promissores para o diagnóstico sorológico da NC, porém, não foram representativos dos epítomos imunodominantes presentes em cisticercos de *T. solium*. Outras seqüências de aminoácidos necessitam ser ensaiadas, a fim de obter um complexo antigênico sintético equivalente ao antígeno nativo, porém, o alto custo da síntese dos peptídeos ainda é uma barreira que limita a investigação de novos MAPs.

Palavras chaves: cisticercose, peptídeos sintéticos, antigenicidade e diagnóstico.

FARIAS, C.R. **Selected synthetic peptides from amino acids sequences of *Taenia crassiceps* and homologous to *Taenia solium* with potential application to diagnosis of cysticercosis.** 2006. 114 p. Dissertation (master's degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Taenia crassiceps antigens have been showed like one alternative rote to the immunodiagnosis of neurocysticercosis (NC), where 18- and 14-kDa fractions have been considered specific. In this study, six peptides were synthesized based on 10, 14 and 18 kDa fractions of amino acids sequence of proteins of the *T.crassiceps* and homologous to *T. solium*. Peptides were divided in "a" and "b", denominated P1a, P2a, P3a and P4a and P1b, P3b and P4b, being that amino acids sequences of the "a" peptides are one internal sequence of the "b" peptides. In antigenic study of the peptides conducted by ELISA, isolated P1a and P4a peptides or used like multiple antigenic peptides (MAP) with two, three or four peptides, cross-reacted with anti-vesicular fluid of the *T. crassiceps* hyperimmune serum, while that, MAPs with only P2a and P3a did not showed antigenicity. Monoclonal antibodies (Mabs) anti-*T. crassiceps* (n=3) and anti-*T.solium* (n=19) Mabs recognized in decreasing order, P1b (72,7%), P1a (45,5%) and P3a and P2a (9,1%), while, P3b, P4a and P4b did not showed reactivity with Mabs used. In human serum samples of the patients with neurocysticercosis (NC) and serum healthy individuals (HI), where P1b and P1a peptides were analyzed isolated or in MAPs with three or four peptides, both of them showed antigenic potential. The evaluation of the ELISA tests with synthetic peptides isolated or in MAPs, P1b and MAP-a (P1a+P3a+P4a), respectively, was analyzed in three different *cut off*, a, b and TG-Roc. Based on its, ELISA assayed with P1b

showed 59,0-79,5% positivity when NC serum samples were tested (n=39); 1,3-11,8% with HI serum samples (n=76); 3,4-10,2% with human serum samples of the patients with hydatidosis from Rio Grande do Sul (H-R) (n=59); 0,0-50,0% with human serum samples of the patients with hydatidosis from Peru (H-P) (n=8) and 0,0-9,1% with human serum samples of the patients with other parasitoses (OP) (n=33). By the way, ELISA assayed with MAP-a showed 57,7-92,3% positivity with NC (n=26); 1,4-9,6% with HI (n=73); 0,0-13,3% with H-R (n=15) and 12,5-37,5% with H-P (n=8). On the attempt of increase the positivity of the ELISA test using synthetic peptides, 18- and 14-kDa fractions of the *T. crassiceps* was added, but they did not promoted more antigenicity. Synthetic peptides used showed promising results on neurocysticercosis serodiagnosis, but they were no representatives of dominant epitopes present in *T. solium* cysticercus. Other amino acid sequences need be used to have a synthetic antigenic complex similar to native antigens, however, the high cost of the peptide synthesis still is a problem that limit the study of the new MAPs.

Key Words: cysticercosis, synthetic peptides, antigenicity and diagnosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

18/14: antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps*

AcMos: Anticorpos monoclonais

Anti-Tcra: anticorpos anti-*Taenia crassiceps*

Anti-Tso: anticorpos anti-*Taenia solium*

Anti-ES-Tcra: anticorpos anti- antígeno de excreção e secreção de cisticercos de *Taenia crassiceps*

Anti-LV-Tso: anticorpos anti- antígeno de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*

Anti-T-Tso: anticorpos anti- antígeno total de *Taenia solium*

Boc: Técnica para síntese de peptídeos que emprega a t-butiloxicarbonila como protetor dos grupos reativos dos aminoácidos.

C-N: Ligação peptídica que ocorre na direção do grupamento carboxila para o grupamento amina.

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ES-Tcra: antígeno de excreção e secreção de cisticercos de *Taenia crassiceps*

E-Tso: antígeno de escólex de *Taenia solium*

Fmoc: Técnica para síntese de peptídeos que emprega a 9-fluorenilmetoxycarbonila como protetor dos grupos reativos dos aminoácidos.

GP: glicoproteínas

H-P: amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru

H-R: amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul

II: Índice de instabilidade das proteínas

ISS: amostras de soros de indivíduos supostamente saudáveis

LCR: líquido cefalorraquiano

LV-Tcra: Antígeno de líquido vesicular de *Taenia crassiceps*

LV-Tso: antígeno de líquido vesicular de cisticercos de *Taenia solium*

T-Tso: antígeno total de Taenia solium

MAP: múltiplos peptídeos antigênicos

MAP-a: múltiplos peptídeos antigênicos contendo P1a e P3a a 2,5 µg de cada e 1,75 µg de P4a.

N-C: Ligação peptídica que ocorre na direção do grupamento amina para o grupamento carboxila.

NC: neurocisticercose/ amostras de soros de pacientes com neurocisticercose

OP: amostras de soros de pacientes com outras parasitoses

P1a: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos D-D-K-G-P-E-D-L-K-K-K-M-M-K-Q-L-G-E-V-R-R-F-F-R-E-D-P-L-G

P1b: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos L-A-I-L-V-I-T-V-V-A-A-P-T-D-D-K-G-P-E-D-L-K-K-K-M-M-K-Q-L-G-E-V-R-R-F-F-R-E-D-P-L-G

P2a: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos K-K-K-M-M-K-Q-L-G-E-V-R-R

P3a: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos R-I-R-K-R-L-G-E-Y-L-K

P3b: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos I-P-E-R-I-R-K-R-L-G-E-Y-L-K-G-L

P4a: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos A-P-T-D-D-K-R-V-I-D-L-K-K

P4b: Peptídeo sintético contendo a seqüência de aminoácidos A-P-D-D-P-K-G-V-E-D-T-Y-P-Y-Q-A-P-T-D-D-K-R-V-I-D-L-K-K

PBS: Tampão fosfato salina (Na_2HPO_4 0,0075 M, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2)

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

PI: ponto isoelétrico

RMN: ressonância magnética nuclear

SNC: sistema nervoso central

T. crassiceps: *Taenia crassiceps*

T. solium: *Taenia solium*

TC: tomografia computadorizada

TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

T-Tso: antígeno total de cisticercos de *Taenia solium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química de P1a.....	49
Figura 2- Estrutura química de P1b.....	49
Figura 3- Estrutura química de P2a.....	50
Figura 4- Estrutura química de P3a.....	50
Figura 5- Estrutura química de P3b.....	50
Figura 6- Estrutura química de P4a.....	51
Figura 7- Estrutura química de P4b.....	51
Figura 8- Absorbâncias obtidas em ELISA com os peptídeos sintéticos, sendo A: Valores com P1a, P2a, P3a ou P4a (5,00 µg/poço) utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra (C+ 1:50) e soro controle negativo (C-1:50) diluídos a 1:50 e B: Valores com MAP contendo dois (0,50 µg de cada/poço); três (1,50 µg de cada/poço) ou quatro peptídeos sintéticos (1,00 µg de cada/ poço) utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra diluído a 1:50 (C+1:50) e soro controle negativo diluído a 1:50 (C-1:50). Também foram realizados ensaios dos mesmos soros com antígeno LV-Tcra a 0,10 µg/poço e 18/14 a 0,05 µg/poço.....	66

Figura 9- Absorbâncias obtidas em ELISA com peptídeos sintéticos, utilizando dois (utilizados com P1a ou MAP) ou quatro soros de pacientes com neurocisticercose (dados em vermelho) e cinco soros de indivíduos supostamente saudáveis (dados em preto). **A:** Valores com peptídeos sintéticos isolados P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a ou P4b (5,00 µg/poço) e **B:** Valores com MAPs, P1a+P4a (2,00 µg de cada/poço), P1b+P3b (0,25 µg de cada/poço), P1b+P4b (0,25 µg de cada/poço), P1a+P2a+P4a (2,25 µg de cada/poço), P1a+P3a+P4a (2,25 µg de cada/poço), P1b+P3b+P4b (0,25 µg de cada/poço), P2a+P3a+P4a (2,25 µg de cada/poço) e P1a+P2a+P3a+P4a (1,50 µg de cada/poço).....70

Figura 10- Absorbâncias obtidas em ELISA com P1b (0,25 µg/poço) ou MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada e P4a a 1,75 µg/poço) utilizando amostras de soros humanos, sendo respectivamente: **A:** 39 ou 26 amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e 76 ou 73 de indivíduos supostamente saudáveis (ISS). **B:** ELISA com P1b, 33 amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (OP), 59 de pacientes com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul (H-R) e oito de pacientes com hidatidose provindos do Peru (H-P). Em paralelo, ELISA com MAP-a, 15 H-R e 8 H-P.....75

Figura 11- Absorbâncias obtidas em ELISA com a adição do antígeno 18/14 (0,05 µg/poço) aos peptídeos sintéticos (P1b, P3b e P4b a 0,10 µg de cada/poço), utilizando 27 soros de pacientes com neurocisticercose reativos em ELISA com 18/14 (NC1), 8 não reativos (NC2) e 30 soros de indivíduos supostamente saudáveis (ISS).....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alinhamento das seqüências de aminoácidos (aa) de *T. crassiceps*: (1) proteína de 10 kDa descrita por Zarlenga et al. (Gene Bank® gi 463900), (2) 18 e 14 kDa descritas por Espindola (2004) e (3) 14 kDa descrita por Peralta et al. (2002) e seqüências de aminoácidos de *T. solium*: (4) antígeno m13h de baixo peso molecular de excreção e secreção descrito por Ferrer et al. (Gene Bank® gi 24940275). Acesso Gene Bank® UO7150.....44

Tabela 2- Seqüências de aminoácidos dos peptídeos sintetizados (P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b) com base na proteína de 10 kDa (Gene Bank® gi 463900), 18 e 14 kDa seqüenciadas por Espindola (2004) e 14 kDa de *T. crassiceps* descrita por Peralta et al. (2002).....47

Tabela 3- Características químicas dos peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b deduzidas utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.....48

Tabela 4- Características dos AcMos obtidos por Espindola et al. (2002): anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso.....54

Tabela 5- Número e positividade das amostras de soros humanos de pacientes com neurocisticercose (NC), indivíduos supostamente saudáveis (ISS), soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru (H-P) e do Rio Grande do Sul (H-R) e de pacientes com outras parasitoses (OP) em teste ELISA com antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* (ELISA 18/14) e Imunoblot com antígeno de LV-Tcra (Imunoblot LV-Tcra) utilizadas na análise dos peptídeos sintéticos.....57

Tabela 6- Seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps*, Gene Bank® gi 463900, e a homologia referente à porção comparada apresentada por outros autores utilizando seqüências de *T. crassiceps* e *T. solium*.....64

Tabela 7- Homologia dos peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b comparada a porções das seqüências de aminoácidos das proteínas de *T. solium* e de *T. crassiceps* apresentadas por outros autores.....65

Tabela 8- Absorbâncias obtidas em ELISA utilizando os peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b (5,00 µg/poço), antígeno LV-Tcra (0,10 µg/poço), 18/14 (0,05 µg/poço) e T-Tso (1,00 µg/poço) com AcMos anti-*T. solium* e anti-*T. crassiceps*. Considerado *cut off* de 0,50 de absorbância para análise dos resultados..... 68

Tabela 9- Positividade do teste ELISA para o estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos isolados e MAPs utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra (C+1:50 e 1:200) e soro controle negativo (C-1:50), três anticorpos monoclonais (AcMo) anti-*T. crassiceps* e 19 anti-*T. solium* e duas (P1a e MAPs) ou quatro amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC).....73

Tabela 10- Positividade do teste ELISA com P1b (0,25 µg/poço) ou MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada e P4a a 1,75 µg/poço) e amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC), supostamente saudáveis (ISS), com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul (H-R) ou do Peru (H-P) e com outras parasitoses (OP).....77

Tabela 11- Positividade do teste ELISA com P1b, MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada/poço e P4a a 1,75 µg/poço), 18/14+P1b e 18/14+P1b+P3b+P4b utilizando as mesmas amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC 1 e 2) e de indivíduos supostamente saudáveis (ISS). Peptídeos sintéticos a 0,10 µg/poço e 18/14 a 0,05 µg/poço.....81

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	24
1.1- ASPECTOS GERAIS	25
1.2-ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA CISTICERCOSE	28
1.3- DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE	31
1.3.1- Pesquisa de anticorpos	34
1.3.2- Antígenos alternativos	36
1.3.2.1- Antígeno heterólogo de <i>T. crassiceps</i> para pesquisa de anticorpos	36
1.3.2.2- Peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes	37
2- OBJETIVOS	42
3- MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS	43
3.1.1- Seqüências de aminoácidos de <i>T. crassiceps</i> utilizadas para a síntese dos peptídeos	43
3.1.2- Análise do potencial hidrofílico da seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de <i>T. crassiceps</i> (Gene Bank® gi 463900)	44
3.1.3- Análise da homologia da seqüência utilizada para síntese dos peptídeos comparada a outros seqüenciamentos	45
3.1.4- Síntese dos peptídeos	45
3.1.5- Apresentação dos peptídeos sintetizados com base na seqüência de aminoácidos de <i>T. crassiceps</i> descrita por Zarlenga et al. (Gene Bank® gi463900), Espindola (2004) e Peralta et al. (2004)	46
3.1.6- Características químicas dos peptídeos sintéticos	47
3.2- PARASITAS	52
3.3- EXTRATOS ANTIGÊNICOS	52

3.3.1- Antígenos de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	52
3.3.2- Antígenos de <i>T. solium</i>	53
3.3.3- Análise dos extratos antigênicos.....	53
3.4- AMOSTRAS UTILIZADAS.....	53
3.4.1- Soro hiperimune anti-LV-Tcra.....	54
3.4.2- Anticorpos monoclonais (AcMos).....	54
3.4.3- Soros humanos.....	55
3.5- ESTUDO DA ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	57
3.5.1- Esquema do estudo da antigenicidade.....	58
3.5.1.1- Soro hiperimune.....	58
3.5.1.2- AcMos.....	58
3.5.1.3- Soros Humanos.....	58
3.6- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE.....	59
3.6.1- P1b.....	59
3.6.2- MAP-a.....	59
3.7- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	60
3.8- PROTOCOLO DO ELISA COM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E/OU OUTROS ANTÍGENOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS.....	60
4- RESULTADOS	63
4.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	63
4.1.1- Análise do potencial hidrofílico da sequência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de <i>T. crassiceps</i> (Gene Bank® gi 463900).....	63
4.1.2- Análise da homologia da sequência utilizada para síntese dos peptídeos comparada a outros seqüenciamentos.....	63

4.2- ESTUDO DA ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	65
4.2.1- Utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra.....	65
4.2.2 - Utilizando AcMos anti- <i>T. solium</i> e anti- <i>T. crassiceps</i>	67
4.2.3- Utilizando amostras de soros humanos.....	70
4.3- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE.....	74
4.3.1- P1b.....	78
4.3.2- MAP-a.....	78
4.4- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS..	79
5- DISCUSSÃO.....	82
5.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	82
5.2- ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	84
5.2.1- Utilizando soro hiperimune.....	86
5.2.2- Utilizando anticorpos monoclonais.....	87
5.2.3- Utilizando amostras de soros humanos.....	89
5.3- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE.....	90
5.4- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS..	94
5.5- DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA NEUROCISTICERCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	96
6- CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXOS.....	112

1- INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, freqüentes parasitoses intestinais e associadas, como a causada pela *Taenia solium*, são responsáveis por impactos sociais e econômicos importantes em termos de morbidade e mortalidade (RAMOS JUNIOR et al., 2004).

Neste aspecto, estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da neurocisticercose (NC), forma neurológica da cisticercose, que contribuam para a correlação da sintomatologia, dos parâmetros sorológicos e neurológicos, com a epidemiologia, são de grande valia, colaborando para o desenvolvimento de um diagnóstico rápido, melhorias nas medidas profiláticas e de controle adotadas, além, da possibilidade de um tratamento precoce dos pacientes.

Nas últimas décadas, o diagnóstico laboratorial da NC utilizando amostras de soro e líquido cefalorraquiano (LCR) apresentou importantes resultados com o uso de antígenos de cisticercos de *T. solium* brutos (BUENO et al., 2000) e ricos em glicoproteínas (PLANCARTE et al., 1999; TSANG; BRAND; BOYER, 1989) e antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* brutos (BUENO et al., 2000; VAZ et al., 1997) e purificados (ESPINDOLA et al., 2005; PERALTA et al., 2002), porém, a dificuldade da manutenção dos cisticercos de *T. solium*, o alto custo das técnicas de purificação de antígenos e a utilização de animais experimentais de pequeno e médio porte, tornam estas técnicas menos atrativas do que o uso de peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes.

Os itens a seguir comentados salientam pontos básicos do complexo teníase-cisticercose, tais como: ciclo biológico, medidas profiláticas e de controle, dados clínico-epidemiológicos, além, da trajetória do estudo diagnóstico laboratorial da cisticercose para a pesquisa de anticorpos, utilizando antígenos homólogos,

heterólogos e alternativos e, a pesquisa de antígenos, para validar as estimativas para o desenvolvimento do modelo antigênico estudado neste trabalho, os peptídeos sintéticos.

Assim, este trabalho visou a síntese de peptídeos desenvolvidos a partir de seqüências gênicas de *T. crassiceps* com homologia com as de *T. solium*, a fim de realizar primeiramente a análise da antigenicidade dos peptídeos utilizando soro hiperimune anti-líquido vesicular de *T. crassiceps*, anticorpos monoclonais anti-*T. solium* e anti-*T. crassiceps* e amostras de soros humanos para avaliar o seu potencial para a utilização no sorodiagnóstico da cisticercose em teste ELISA. Após, o sorodiagnóstico foi realizado utilizando amostras de soros de pacientes com NC, com outras parasitoses e de indivíduos supostamente saudáveis e os dados apresentados como promissores na busca de um antígeno sintético representativo dos epítomos imunodominantes presentes em cisticercos de *T. solium*.

1.1- ASPECTOS GERAIS

As manifestações clínicas decorrentes do complexo teníase-cisticercose constituem um importante problema de saúde pública em regiões em que há carência de educação sanitária, política de saúde, falta de inspeção de carnes suínas e saneamento básico, além da presença de determinados hábitos alimentares, como a ingestão de carne de suínos crua ou mal cozida. Os impactos de maior recorrência, em termos de mortalidade e morbidade em humanos e suínos são os danos teciduais, cerebrais e intestinais, associados ou até mesmo isolados (RAMOS JUNIOR et al., 2004).

O homem é o hospedeiro definitivo da *T. solium* e desenvolve o verme adulto no intestino delgado após a ingestão dos cisticercos, que é a forma larvária do parasita, contidos em carne de suíno contaminada, crua ou mal cozida. A esta parasitose intestinal denomina-se de teníase (VAZ; LIVRAMENTO, 1996). O homem contaminado, ao eliminar os ovos embrionados de *T. solium* no ambiente, propicia para que o suíno ou acidentalmente o próprio homem possa ingerir os ovos viáveis, presentes em alimentos ou água contaminada com material fecal e, desenvolva a cisticercose, que é a presença de cisticercos em tecidos ou órgãos. A NC é a forma mais grave da patologia, com a presença dos cisticercos no sistema nervoso (PESSOA, 2001).

O principal fator de risco para a presença do complexo teníase-cisticercose ativo em uma determinada região do país é a presença do parasita nas adjacências das moradias (FLISSER et al., 2003), sendo ainda salientado que em regiões endêmicas, 30% dos suínos podem estar contaminados (GONZALEZ et al., 1990). Países em que o consumo da carne suína é regrado por aspectos religiosos, como os judeus e muçulmanos, pode-se verificar mais facilmente o controle sobre os casos de teníase, porém, a cisticercose continua sendo possibilitada (SCHANTZ et al., 1992).

Devido às graves manifestações clínicas, principalmente decorrentes da NC, a implantação de medidas profiláticas torna-se necessária, porém, ainda consideradas de difícil realização nos países em desenvolvimento. Sugere-se o efetivo saneamento básico, hábitos de higiene, controle da água consumida e a rigorosa inspeção da carne suína, além, do diagnóstico precoce da teníase, devido ao risco da continuidade do ciclo pela cisticercose (GARCIA et al., 2002).

Estima-se que 22-34% dos pacientes com NC possuam antecedentes familiares de casos de teníase, porém, a positividade do exame coproparasitológico é extremamente baixa, dificultando o diagnóstico e tratamento destes pacientes, transmissores, em potencial, do parasita (AGAPEGEV, 2003).

Adicionalmente às medidas profiláticas, algumas alternativas de controle dos casos de teníase e cisticercose foram propostas por outros autores, como: o desenvolvimento de educação sanitária em escolas, para o entendimento da relação existente entre suínos contaminados e os casos de NC; desenvolvimento de vacinas e o tratamento em massa de suínos e humanos, mas, neste último caso, aspectos importantes podem ser negligenciados, como: as re-infecções e a contaminação remanescente do solo, que levariam anos para a estabilidade (GONZALEZ et al., 2003).

Estratégias de erradicação do complexo teníase-cisticercose podem ser desenvolvidas, pois, o ser humano é o único hospedeiro definitivo para a *T.solium*. Assim, a inspeção da carcaça de suínos pode ser útil, devido à ausência de hospedeiros selvagens, além do acesso a medicamentos eficazes contra cisticercos e ovos de *T. solium* (FLISSER et al., 2003).

Os programas de erradicação de doenças, assim como os de profilaxia e de controle, antes de serem implantados, devem ser consideradas as condições econômicas disponíveis, pois, a falta de recursos para a sustentação das campanhas de educação sanitária pode ser um fator limitante para o sucesso do programa. Devido a esta e outras dificuldades, como: a falta de estudos epidemiológicos (DIAZ et al., 1992) e a carência de infra-estrutura higiênico-sanitária (SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993), os programas de erradicação

ainda são considerados inviáveis para os países em desenvolvimento, como o Brasil.

1.2- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS DA CISTICERCOSE

A cisticercose é uma patologia universal, com distribuição mais freqüente em países da América latina, África e Ásia (SILVA-VERGARA et al., 1995). Alguns autores apresentaram relevantes estudos epidemiológicos sobre 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) e Bolívia (NICOLETTI et al., 2005), demonstrando a presença do complexo *teníase-cisticercose* nestes locais.

A NC atualmente não é freqüente em países desenvolvidos, como o Japão e o Canadá (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001), entretanto, 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 (SCHANTZ et al., 1993). Em Los Angeles, 138 casos de pacientes com NC foram detectados entre 1988 e 1990, 85% destes, eram provenientes de imigrantes, 7% de pacientes que tiveram contato com o parasita em países endêmicos e 8% a doença foi adquirida no local (SCHANTZ et al., 1999).

Pelo fato de haver o desnivelamento tecnológico demonstrado entre os estados brasileiros e a inexistência de estudos epidemiológicos sistematizados, ocorrem dificuldades na obtenção de referências sobre estudos da cisticercose humana e suína em estados do norte e centro-oeste (AGAPEJEV, 2003). Assim, no Brasil, o desenvolvimento de técnicas imunodiagnósticas para a pesquisa de antígenos de *T.*

solium e anticorpos anti-cisticercos pode auxiliar os estudos de prevalência no país e estimar as regiões brasileiras que possuam o maior número de indivíduos com cisticercose suína e humana.

Mesmo considerando as dificuldades existentes, pelo uso relativo de publicações sobre NC de cada estado em relação a população do país segundo o *Censo* de 2000, verifica-se que embora subestimada, a prevalência da NC está representada, em ordem decrescente, no Distrito Federal, estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Em hospitais gerais, a média da frequência de pacientes com NC é de 1,13%, tendo São Paulo o menor valor (0,19%) e o Paraná o maior valor (4,80%) (AGAPEJEV, 2003).

A teníase-cisticercose não é uma doença de notificação compulsória, e assim, torna-se mais difícil o acompanhamento de um estudo mais apurado no território nacional. Além disso, a cisticercose, por possuir grande complexidade em seu diagnóstico e tratamento, os casos suspeitos são, em geral, tratados em grandes centros urbanos, podendo resultar na perda da procedência destes pacientes (SILVA-VERGARA et al., 1995), e, talvez, erroneamente, a região urbana ser considerada como prevalente das formas mais graves da NC (AGAPEJEV, 2003).

Ribeirão Preto, São Paulo, foi a cidade pioneira de notificação compulsória para cisticercose. Segundo Takayanagui e Leite (2001), a prevalência de NC entre 1992-1999 foi de 74 casos/100.000, apresentando 21% dos infectados 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 outros locais do país.

A cisticercose 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 uma forma geral, enquanto o parasita está vivo, observa-se pouca ou nenhuma resposta inflamatória local, ocorrendo uma imunotolerância do hospedeiro aos cisticercos presentes. Considerável resposta imunológica ocorre quando os parasitas iniciam a sua degeneração, havendo a formação de um granuloma, estimulado pela resposta inflamatória do hospedeiro no tecido atingido e resultando em um edema. Ocorre a liberação maciça de antígenos, grande quantidade de anticorpos, imunocomplexos e exacerbação do processo inflamatório (RAHALKAR, 2000).

A NC ocorre predominantemente entre indivíduos de 21-40 anos de idade, com maior frequência em pacientes do sexo masculino, porém, as manifestações mais graves foram observadas nos pacientes do sexo feminino (AGAPEJEV, 2003).

A NC consiste da presença de cisticercos no sistema nervoso, sendo os locais de maior acesso, as leptomeníngeas, os ventrículos e o parênquima cerebral, podendo ainda raramente ser encontrado no canal espinhal (LIVRAMENTO; MACHADO; SPINA-FRANÇA, 1993), lobos parietais e frontais predominantemente à direita (AGAPEJEV, 2003) e quarto ventrículo (GARCIA et al., 2002).

A sintomatologia pode ocorrer após dias, meses ou anos após a infecção, dependendo da localização, do tamanho e do número dos cisticercos viáveis ou calcificados presentes (NASH, 2003), da resposta imunológica do hospedeiro (RAHALKAR, 2000), além, de variáveis culturais, nutricionais e genéticas, tanto do hospedeiro quanto do parasita (AGAPEJEV, 2003). Assim, o polimorfismo clínico demonstrado pelos pacientes com NC é o resultado de uma resposta imune que é

imprevisível, 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 (NEVES, 2000).

O tratamento dos pacientes com NC geralmente é individualizado e de acordo com os sintomas do paciente, empregando-se, dependendo do caso, antiepilépticos, analgésicos, corticosteróides, processo cirúrgico ou a combinação dos mesmos.

O alto custo das hospitalizações, que geralmente ocorrem de 1-254 dias (GARCIA; DEL BRUTTO, 2000), do tratamento e das perdas salariais, sustentam a necessidade de um diagnóstico precoce com alta sensibilidade, para que desta forma, as regiões com alta prevalência possam atuar de forma mais específica no combate da parasitose.

1.3- DIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE

O diagnóstico da NC é guiado pela clínica do paciente, por exames de imagem, como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN), e a análise do líquido cefalorraquiano (LCR). Estes exames também são utilizados no acompanhamento da evolução da doença (LIVRAMENTO; MACHADO; SPINA-FRANÇA, 1993).

Molinari et al. (2002) demonstraram que a classificação da NC pode ser realizada de acordo com o estágio biológico, morfologia do cisticerco e resposta inflamatória

do hospedeiro. Com o emprego da TC e da RMN, a NC foi classificada em forma ativa (com o cisticerco ativo), forma transitória (com o cisticerco em degeneração), forma inativa (quando o cisticerco está calcificado) e mista (quando são encontradas duas ou mais formas).

Del Brutto et al. (2001) desenvolveram uma proposta de critérios para o diagnóstico da NC baseado em quatro classes: critérios absolutos, critérios maiores, critérios menores e critérios epidemiológicos. As classes foram importantes para delimitar o grau de confiabilidade de um diagnóstico para NC, sendo este grau variável em: diagnóstico definitivo, provável diagnóstico e possível diagnóstico. Assim, a integração dos resultados dos exames de imagem, clínico, imunológico e dados epidemiológicos foi realizada a fim de estimar os parâmetros apresentados.

A manifestação dos sintomas não específicos e o alto custo dos exames de imagem dificultam o diagnóstico da NC (FERRER et al., 2005). Assim, a utilização de marcadores imunológicos presentes em amostras de soro ou LCR de pacientes com NC torna viável o diagnóstico laboratorial, com menor custo em relação aos exames de imagem e aumentando a possibilidade de ampliação das unidades de saúde capazes de realizar o diagnóstico e o acompanhamento dos casos de tratamento dos pacientes.

No decorrer dos anos, o uso dos antígenos brutos (BUENO et al., 2000), purificados (ESPINDOLA et al., 2005) e, mais recentemente, a obtenção dos peptídeos sintéticos (BUENO et al, 2005; FERRER et al., 2005) e antígenos recombinantes (MONTERO et al, 2003), têm sido utilizados na tentativa de obter um ensaio imunológico cada vez mais eficiente e específico.

Inicialmente, observou-se que principalmente na vigência da degeneração do parasita e com a intensificação da reação inflamatória e resposta imune (CARPIO,

2002), a produção intratecal de imunoglobulinas poderia ser detectada em ensaios imunológicos (VAZ et al., 1997), resultando em uma análise da resposta imunológica local, devido aos compostos de alto peso molecular, como os anticorpos, não atravessarem a barreira hemato-encefálica.

A presença de anticorpos em uma amostra de soro ou LCR humano pode persistir por longos períodos, mesmo após a eliminação do parasita, devido à variabilidade individual da resposta imune e/ou por tratamento com drogas (GARCIA et al., 1998). Ensaio imunológico para a detecção de anticorpos, embora, com indiscutível valor diagnóstico, pode indicar também, apenas a exposição ao patógeno (FERRER et al., 2005), mesmo relacionando com o uso do LCR destes pacientes, pois, em casos de processos inflamatórios, como, por exemplo, na meningite, o equilíbrio da barreira hemato-encefálica pode não ser mantido, e assim, serem detectados os anticorpos circulantes (ESPINDOLA et al., 2005).

Outros inconvenientes com o uso de LCR podem ser enumerados, como: a dificuldade para coleta da amostra, considerada como um processo invasivo e doloroso e a possibilidade de falso-negativo, dependendo da fase da NC na ocasião da coleta (ESPINDOLA et al., 2005).

A baixa sensibilidade obtida por Earnest et al. (1987) com a utilização de soros foi suprida por Plancarte, Fexas e Flisser (1994) e outros autores (BUENO et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2005) ao realizar ensaios sorológicos com frações antigênicas purificadas, tornando, portanto, uma alternativa viável para o diagnóstico da NC.

FERRER et al., 2005 comentam que seus próximos estudos serão realizados com soros de pacientes com casos confirmados de NC. Esta tendência diagnóstica pode ser explicada pela facilidade de coleta da amostra, obtenção de maiores

volumes e pela possibilidade de realizar a punção constantemente. Assim, como com o uso de LCR, a padronização de ensaios com soros humanos podem ressaltar inconvenientes, como: resultados falso-positivos pela ocorrência de reatividade cruzada com outras patologias, particularmente com outras doenças parasitárias (ISHIDA et al., 2003) e ainda em indivíduos saudáveis (BUENO et al., 2000), porém, as vantagens existentes superam as desvantagens.

A seguir, segue a trajetória do diagnóstico imunológico da NC baseando-se na pesquisa de anticorpos anti-cisticercos.

1.3.1- Pesquisa de anticorpos

Inicialmente, os métodos utilizados para detectar anticorpos anti-cisticercos no soro e LCR eram: reação de fixação do complemento (reação de Weimberg), hemaglutinação indireta e imunofluorescência (LIVRAMENTO, 1981; MOSES, 1911; NIETO, 1956). Com o passar dos anos, a detecção de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* por ELISA e Imunoblot tornaram-se os métodos mais utilizados para o diagnóstico da cisticercose humana e suína (ESPINDOLA et al., 2005; ITO et al., 1998; TSANG; BRAND; BOYER, 1989;).

ELISA realizado com antígeno bruto de cisticercos de *T. solium* e amostras de soro e LCR apresentaram índices de sensibilidade, respectivamente de 70,6% e 94,1%, e especificidade de 80,0% e 100,0% (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; FEXAS; FLISSER, 1994; PLANCARTE et al., 1999; RESTREPO et al., 2000; RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997; TSANG;

BRAND; BOYER, 1989), porém, estudos sugerem o uso de um antígeno de obtenção rápida, com técnicas de fácil execução e de menor custo.

Pela técnica de coluna de afinidade de lentil-lectina, Tsang, Brand e Boyer (1989), caracterizaram um grupo de sete GP - 50, 42-39, 24, 21, 18, 14 e 13 kDa de *T. solium* por Immunoblot utilizando soro e LCR de pacientes com NC, em que a GP42 e a GP24 foram as que freqüentemente foram reconhecidas por anticorpos presentes nas amostras de soros destes pacientes. Esta técnica apresentou 98,0% de sensibilidade e 100,0% de especificidade, sendo assim, a Organização Panamericana de Saúde também o reconheceu para o uso no diagnóstico sorológico para NC, da mesma maneira que o ELISA com antígenos de cisticercos de *T. solium* utilizados em países em desenvolvimento (FERRER et al., 2005).

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, porém, pode-se deparar com algumas dificuldades para a sua obtenção, como: a necessidade de animais de médio porte, a falta de homogeneidade ou quantidade para a garantia da qualidade dos lotes, baixo rendimento, rompimento dos cisticercos no momento da retirada do músculo e contaminação antigênica com proteínas dos suínos, tornando inviável os procedimentos de purificação (ESPINDOLA, 2004), além, de serem considerados trabalhosos e de baixo rendimento (RESTREPO et al., 2000).

Como alternativa, no imunodiagnóstico da NC, antígenos heterólogos de *T. crassiceps* (FREEMAN, 1962) vêm sendo estudados para a pesquisa de anticorpos, na tentativa de obter uma fonte antigênica de fácil manutenção e obtenção, além de ser de qualidade.

1.3.2- Antígenos alternativos

1.3.2.1- 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. Em Imunoblot, proteínas de 72-68 kDa e 95-92 kDa presentes em líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) foram consideradas imunodominantes para o diagnóstico da NC (VAZ, 1993; VAZ et al., 1997).

Outros estudos demonstram que frações antigênicas presentes entre as diferentes espécies de *Taenia*, *T. solium* e *T. crassiceps*, possuem homologia parcial (CHUNG et al., 1999; PERALTA et al, 2002; ZARLENGA et al., 1994) e pelos antígenos de *T. crassiceps* estarem em concentrações suficientes no extrato antigênico, podem ser utilizados como alternativa no diagnóstico laboratorial.

Utilizando ELISA com LV-Tcra, os índices de sensibilidade com soro e LCR foram, respectivamente, de 91,2% e 95,6% e especificidade de 80,0% e 100,0%. Pela técnica de Imunoblot, as proteínas de 131, 121, 109, 74, e <62 kDa (62, 55, 47, 41, 39, 35, 30, 28, 25, 22, 19-13, e 12 kDa) foram consideradas específicas (BUENO et al., 2000).

Antígenos obtidos a partir de cisticercos de *T. crassiceps* foram utilizados por Pardini et al. (2001) para a produção de anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* para a pesquisa de antígenos em amostras de LCR de pacientes com NC. Os índices de sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, de 90,0% e 98,0%. Somente os LCR de pacientes com NC reconheceram frações de baixo peso molecular em Imunoblot utilizando antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps*, apresentando assim, a importância da purificação das proteínas de peso molecular < 20 kDa.

Peralta et al. (2002) sugerem que a fração purificada de 14 kDa do antígeno de *T. crassiceps* possa ser empregada para a detecção de anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* em amostras de soro para levantamentos epidemiológicos e também para a triagem de pacientes com cisticercose, sendo que Espindola et al. (2005) ao utilizar ELISA com frações proteicas de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* e soros de pacientes com NC e de indivíduos supostamente saudáveis, obtiveram 100,0% de sensibilidade e 100,0% de especificidade. Assim, pôde-se estabelecer a importância das proteínas de 18 e 14 kDa no diagnóstico da NC.

1.3.2.2- Peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes

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, que o uso de peptídeos sintéticos torna-se uma alternativa atraente para a padronização de novos ensaios (GREENE et al., 2000).

Em adição, o uso de peptídeos sintéticos no sorodiagnóstico da NC, pode ter como vantagens: a diminuição da variação lote a lote, presente na síntese de

antígenos brutos; não necessita de animais de médio ou pequeno porte para a manutenção dos cisticercos de *T. solium* e *T. crassiceps* e a facilidade de obtenção em larga escala de peptídeos com < 25 resíduos por síntese química (MACHADO et al., 2004).

No processo de purificação do antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps*, anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* são acoplados em coluna com Sepharose 4B (ESPINDOLA et al., 2005), tornando, assim, o processo de alto custo e de grande mão-de-obra. Proteínas sintéticas derivadas das seqüências de aminoácidos das proteínas do parasita podem ser utilizadas para facilitar a obtenção de um grande espectro de epítomos, visto que a fração antigênica pode ser obtida diretamente com a síntese química.

Os peptídeos podem ser desenhados a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas antigênicas do patógeno, previamente selecionadas por algoritmos de hidrofiliçidade, flexibilidade, potencial transmembrana (EISENBERG et al, 1984; KYTE; DOOLITTLE, 1982) ou pela seqüência de aminoácidos de um determinado antígeno em que a eficiência já foi delimitada e comprovada em outros estudos. Desta forma, pode-se realizar o diagnóstico de patologias que apresentem reatividades cruzadas com outros patógenos de características genéticas próximas.

Para o diagnóstico, o soro ou outro líquido corporal também podem ser utilizados contra a porção proteica selecionada previamente por algoritmos em uma biblioteca de peptídeos (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Segundo Machado et al. (2004), para a síntese química dos peptídeos, diferentes técnicas podem ser utilizadas para promover o acoplamento, ou seja, a ligação amida entre dois aminoácidos, como: a ativação do componente carboxílico ou pela adição de um acoplador que irá favorecer a geração do acilante em meio reacional

em presença do componente amínico. Os acopladores incluem etoxiacetileno, as carboiimidas, sais de fosfônio, e de urônio.

A síntese química pode ocorrer em duas modalidades: em solução (síntese clássica) ou em um suporte polimérico, como o poliestireno e o divinilbenzeno (síntese em fase sólida).

Para que ocorra a síntese clássica, geralmente a α -carboxila do receptor de acila é estereificada ou amidada e pode ocorrer na direção N-C terminal ou vice-versa, enquanto que na síntese em fase sólida o grupo carboxila liga-se covalentemente ao polímero por uma ligação forte e ocorre na direção C-N terminal (MACHADO et al., 2004).

Durante a síntese dos peptídeos, pode-se gerar produtos secundários de reação, porém, com a síntese em fase sólida, as vantagens do uso de um polímero insolúvel podem ser evidenciadas no momento em que se encerra esta síntese e inicia-se a etapa de purificação. Ao término de cada etapa, o polímero pode ser lavado e assim, os compostos que não estão ligados ao polímero são eliminados, obtendo um peptídeo praticamente livre de contaminantes (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001).

As estratégias químicas para a síntese dos peptídeos, t-butiloxicarboxila (Boc) e 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc), são determinadas pelos tipos de protetores dos grupos α -amino dos doadores de acila dos aminoácidos, estáveis ao ácido utilizado na técnica, geralmente, trifluoroacético e lábeis a ácidos inorgânicos fortes ou bases orgânicas, respectivamente (MACHADO et al., 2004).

A seleção da estratégia química a ser utilizada depende das características dos aminoácidos a serem ligados. Rovero, Quartara e Fabbri (1991) encontraram dificuldades para acoplar aminoácidos hidrofóbicos, como triptofano e valina pela técnica Boc. Assim, com a estratégia Fmoc podem ser apresentadas vantagens em

alguns casos, como: na síntese de peptídeos contendo aminoácidos lábeis em meio ácido e na preparação de peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos, enquanto, que aminoácidos lábeis a bases orgânicas podem apresentar melhor rendimento na estratégia Boc.

A primeira publicação de estudos sorológicos utilizando peptídeos sintéticos obtidos a partir da seqüência de aminoácidos de *T. crassiceps* foi em 1996 por Gevorkian et al. (1996). Seguindo-se com estudos de outros autores que também apresentaram resultados promissores utilizando seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* (FISCHER et al., 1994; HERNANDEZ et al., 2000; ZARLENGA et al., 1994), *T. saginata* (FERRER et al., 2003; FERRER; MOYANO; BENITEZ, 2003; FLEURY et al., 2003) e *T. solium* (BUENO et al, 2005; FERRER et al, 2005; GREENE et al., 2000; HANCOCK et al., 2003, 2004; MONTERO et al., 2003).

Ensaio com antígenos recombinantes, também têm sido registrados por alguns autores, na tentativa de aliviar os problemas como o controle de qualidade e a fonte antigênica animal. Fisher et al (1994) salientaram que a utilização de antígenos recombinantes não pode ficar limitada apenas a estudos soroepidemiológicos e no diagnóstico clínico da NC, mas também, para os casos de teníases.

Alguns 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), GP 50 (HANKOCK et al., 2004) e rGP50 (BUENO et al., 2005); e os baseados em *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).

Alguns autores supõem que os gastos para a síntese de antígenos recombinantes podem ser maiores do que para peptídeos sintéticos, devido à purificação com anticorpos anti-bactéria, por exemplo (embora também haja processo de purificação para peptídeos sintéticos, porém, com maior praticidade); dificuldades na obtenção de proteínas insolúveis e o alto custo de “primers” e enzimas (GREENE et al., 2000).

Assim, como se conclui da análise de literatura, ainda há um campo aberto para estudos de peptídeos sintéticos utilizados no diagnóstico da NC, que sejam altamente reativos para o emprego no diagnóstico laboratorial, com o anseio de maiores sensibilidades e especificidades, já que os resultados publicados ainda não apresentam índices de avaliação suficientes para serem utilizados exclusivamente no diagnóstico da NC.

O uso de peptídeos sintéticos poderá ser uma alternativa viável para o imunodiagnóstico da NC, com a vantagem de não utilizar animais experimentais e representar menor custo com a automação do processo de obtenção de antígenos. Possibilitará, ainda, o diagnóstico da NC para os diversos centros hospitalares, aumentando a disponibilidade de diagnóstico e acompanhamento do tratamento dos pacientes, além, da realização de um estudo soroepidemiológico em todo o Brasil para indicar a verdadeira prevalência do complexo teníase-cisticercose.

2- OBJETIVOS

Como contribuição ao diagnóstico sorológico da neurocisticercose, o objetivo deste trabalho é o estudo dos peptídeos com potencial uso no diagnóstico da cisticercose, sintetizados a partir de seqüências gênicas de *T. crassiceps* com homologia com as de *T. solium*.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

- Análise do potencial hidrofílico/antigênico e da homologia das proteínas traduzidas de *T. solium* e *T. crassiceps* para escolha dos peptídeos a serem sintetizados.
- Estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos com soro hiperimune, anticorpos monoclonais e amostras de soros humanos.
- Avaliação do potencial dos peptídeos sintéticos para utilização no sorodiagnóstico da cisticercose.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

3.1.1- Seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* utilizadas para a síntese dos peptídeos.

Os peptídeos foram sintetizados com base nas seqüências de aminoácidos das proteínas de 10 kDa de *T. crassiceps* descrita por Zarlenga et al. (Gene Bank® gi 463900), de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* descritas por Espindola (2004) e de 14 kDa de *T. crassiceps* descrita por Peralta et al. (2002) que apresentaram homologia parcial com a seqüência de aminoácidos de *T. solium* descrita por Ferrer et al (Gene Bank® gi 24940275) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>. As seqüências estão apresentadas na **tabela 1**.

Tabela 1- Alinhamento das seqüências de aminoácidos (aa) de *T. crassiceps*: (1) proteína de 10 kDa descrita por Zarlenga et al. (Gene Bank® gi 463900), (2) 18 e 14 kDa descritas por Espindola (2004) e (3) 14 kDa descrita por Peralta et al. (2002) e seqüências de aminoácidos de *T. solium*: (4) antígeno m13h de baixo peso molecular de excreção e secreção descrito por Ferrer et al. (Gene Bank® gi 24940275). Acesso Gene Bank® UO7150.

REF*	aa	SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS																								aa		
1	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	25	
2																					A	P	T	D	D	K	R	
3																						A	P	T	D	P	K	G
4		M	K	A	S	I	F	L	A	L	A	I	L	V	I	T	V	V	A	V	P	A	D	D	K	G		
1	26	P	E	D	L	K	K	K	M	M	K	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	50	
2		V	I	D	L	K	K																					
3		V	E	D	T	Y	P	Y	Q																			
4		Q	E	D	L	K	K	K	M	M	K	H	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G		
1	51	Q	K	I	I	D	E	F	Q	E	T	V	S	I	C	K	A	I	R	E	R	I	R	K	R	L	75	
4		Q	K	I	I	D	Q	F	Q	E	M	I	S	I	A	K	A	I	R	Q	R	I	R	K	R	L		
1	76	G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E															100		
4		G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E																	

REF*: Referências das seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* e *T. solium*.

As seqüências estão alinhadas de acordo com a homologia existente entre os aminoácidos.

3.1.2- Análise do potencial hidrofílico da seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (Gene Bank® gi 463900).

Na tentativa de buscar seqüências de aminoácidos com maior potencial hidrofílico, dois algoritmos foram utilizados como auxílio: Kyte e Doolittle (1982) e Eisenberg et al. (1984), disponíveis em <http://www.expasy.org/cgi/bin/protscale.pl> para analisar a seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (Gene Bank® gi 463900).

3.1.3- Análise da homologia da seqüência utilizada para síntese dos peptídeos comparada a outros seqüenciamentos.

As seqüências de aminoácidos utilizadas para as sínteses de peptídeos foram comparadas a seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* (ESPINDOLA, 2004; FISCHER et al., 1994; PERALTA et al., 2002; ZARLENGA et al. (Gene Bank® gi463900)) e de *T.solium* (CHUNG et al., 1999; FERRER et al. (Gene Bank® gi24940275); GREENE et al., 2000; JIMENEZ; LANDA; BECERRA, 2004) deduzidas por outros autores, a fim de determinar a porcentagem de homologia apresentada.

As seqüências de aminoácidos com maiores potenciais hidrofílicos e homólogas as de *T. solium* foram utilizadas para a síntese dos peptídeos.

3.1.4 Síntese dos peptídeos

Os peptídeos foram sintetizados sob os cuidados da Profa Dra Maria Aparecida Juliano, Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Resumidamente, as sínteses foram realizadas em fase sólida com a estratégia Fmoc. Os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência, qualificados por um espectro de massa, liofilizados e armazenados à temperatura ambiente até o momento de uso.

3.1.5- Apresentação dos peptídeos sintetizados com base na seqüência de aminoácidos de *T. crassiceps* descrita por Zarlenga et al. (Gene Bank® gi 463900), Espindola (2004) e Peralta et al. (2002).

Foram sintetizados sete peptídeos, divididos em “a” e “b”. Os peptídeos “b” possuem prolongamento das seqüências de aminoácidos demonstradas em “a”.

Os peptídeos “a” foram sintetizados e denominados como P1a, P2a, P3a e P4a. **P1a** é uma seqüência situada entre os aminoácidos 22-50, **P2a** uma porção interna de P1a situada entre os aminoácidos 30-42, **P3a** encontra-se entre os aminoácidos 70-80, utilizando como referência a seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (ZARLENGA et al. (Gene Bank® gi 463900)), e **P4a** sintetizado a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* descritas por Espindola (2004), apresentando as duas frações antigênicas, homologia total.

Os peptídeos “b” são constituídos por **P1b**, **P3b** e **P4b**. **P1b** é uma seqüência situada entre os aminoácidos 09-50 da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (ZARLENGA et al. (Gene Bank® gi 463900)), apresentando internamente as seqüências de **P1a** e **P2a**.

P3b possui o prolongamento de cinco aminoácidos de **P3a**. Constitui uma seqüência entre os aminoácidos 67-82 da seqüência da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (ZARLENGA et al. (Gene Bank® gi 463900)), havendo ainda a troca de uma arginina por uma prolina.

P4b possui a adição dos aminoácidos 01-15 da seqüência da proteína de 14 kDa descrita por Peralta et al. (2002), havendo a troca de uma treonina por um ácido

aspártico, ao peptídeo **P4a**. Seguem na **tabela 2** as seqüências de aminoácidos de cada peptídeo sintetizado e a homologia presente entre eles.

Tabela 2- Seqüências de aminoácidos dos peptídeos sintetizados (P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b) com base na proteína de 10 kDa (Gene Bank® gi 463900), 18 e 14 kDa seqüenciadas por Espindola (2004) e 14 kDa de *T. crassiceps* descrita por Peralta et al. (2002).

Ref*	aa	SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS
P1a	29	D D K G P E D L K K K M M K Q L G E V R R F F R E D P L G
P1b	42	L A I L V I T V V A A P T D D K G P E D L K K K M M K Q L G E V R R F F R E D P L G
P2a	13	K K K M M K Q L G E V R R
P3a	11	R I R K R L G E Y L K
P3b	16	I P E R I R K R L G E Y L K G L
P4a	13	A P T D D K R V I D L K K
P4b	28	A P D D P K G V E D T Y P Y Q A P T D D K R V I D L K K

Nomenclaturas adotadas às seqüências de aminoácidos sintetizadas e denominadas como P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b (Ref*) e números de aminoácidos presentes em cada seqüência (aa). Dados em vermelho representam seqüência de aminoácidos homóloga entre P1a, P1b e P2a, dados em rosa representam seqüência de aminoácidos homóloga entre P3a e P3b e dados em azul seqüência de aminoácidos homóloga entre P4a e P4b.

3.1.6- Características químicas dos peptídeos sintéticos

As características químicas dos peptídeos foram deduzidas, utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools/protparam.html> e estão apresentadas na **tabela 3**.

Tabela 3- Características químicas dos peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b deduzidas utilizando o programa “protparam” disponível em <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.

Características Químicas	PEPTÍDEOS SINTÉTICOS						
	P1a	P1b	P2a	P3a	P3b	P4a	P4b
Fórmula molecular	C ₁₅₁ H ₂₃₆ N ₃₃ O ₅₆ S ₂	C ₂₁₂ H ₃₅₅ N ₅₇ O ₆₀ S ₂	C ₆₉ H ₁₃₀ N ₂₄ O ₁₇ S ₂	C ₆₄ H ₁₁₄ N ₂₂ O ₁₅	C ₈₈ H ₁₅₃ N ₂₇ O ₂₂	C ₆₅ H ₁₁₅ N ₁₉ O ₂₁	C ₁₄₀ H ₂₂₀ N ₃₆ O ₄₈
Hidrofobicidade	-1,4	-0,2	-1,6	-1,3	-0,7	-1,1	-1,4
II	55,7	50,7	88,6	24,2	23,5	36,1	29,2
Índice alifático	50,3	99,8	52,3	106,4	121,9	90,0	55,7
M (Da)	3464,0	4726,6	1632,0	1431,7	1941,3	1498,7	3175,5
Nº de átomos	490	686	242	215	290	220	444
PI	8,4	8,4	11,2	11,0	10,3	8,5	4,5
R -	7	7	1	1	2	3	7
R +	8	8	6	5	5	4	5
Aminoácidos							
Ác. Aspártico (D)	13,8%	9,5%	0,0%	0,0%	0,0%	23,1%	21,4%
Alanina (A)	0,0%	7,1%	0,0%	0,0%	0,0%	7,7%	7,1%
Arginina (R)	10,3%	7,1%	15,4%	27,3%	18,8%	7,7%	3,6%
Fenilalanina (F)	6,9%	4,8%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Glicina (G)	10,3%	7,1%	7,7%	9,1%	12,5%	0,0%	3,6%
Glutamato (E)	10,3%	7,1%	7,7%	9,1%	12,5%	0,0%	3,6%
Glutamina (Q)	3,5%	2,4%	7,7%	0,0%	0,0%	0,0%	3,5%
Isoleucina (I)	0,0%	4,8%	0,0%	9,1%	12,5%	7,7%	3,6%
Leucina (L)	10,3%	11,9%	7,7%	18,2%	18,8%	7,7%	3,6%
Lisina (K)	17,2%	11,9%	30,8%	18,2%	12,5%	23,1%	14,3%
Metionina (M)	6,9%	4,8%	15,4%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Prolina (P)	6,9%	7,1%	0,0%	0,0%	6,3%	7,7%	14,3%
Tirosina (Y)	0,0%	0,0%	0,0%	9,1%	6,3%	0,0%	7,1%
Treonina (T)	0,0%	4,8%	0,0%	0,0%	0,0%	7,7%	7,1%
Valina (V)	3,5%	9,5%	7,7%	0,0%	0,0%	7,7%	7,1%

Propriedades químicas das seqüências de aminoácidos dos peptídeos sintéticos, sendo apresentada a média de hidrofobicidade (hidrofobicidade), o índice de instabilidade (II), a massa molecular (M), o ponto isoelétrico (PI), resíduos de aminoácidos carregados negativamente (R-) e positivamente (R+).

Os peptídeos estão apresentados nas **figuras 1 a 7** com sua possível estrutura química, baseando-se no programa “Chemsketch” disponível em <http://www.acdlabs.com>.

Figura 1- Estrutura química de P1a.

Figura 2- Estrutura química de P1b.

Figura 3- Estrutura química de P2a

Figura 4- Estrutura química de P3a.

Figura 5- Estrutura química de P3b.

[illegible]

Figura 7- Estrutura química de P4b.

3.2- PARASITAS

Animais experimentais foram utilizados após parecer favorável do Comitê de Ética para experimentações animais da FCF/USP (projeto 13/2003), adotado pelo Comitê Brasileiro de Animais Experimental.

Os cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF (FREEMAN, 1962), foram cedidos gentilmente em 1989, pelo Prof. Dr. Carlos Larralde do Instituto de Investigaciones Biomédicas da Universidad Nacional Autónoma do México e vêm sendo mantidos desde 1990 por passagens intraperitoneais de 10-15 larvas jovens, a cada 90 dias, em camundongos BALB/c fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, segundo metodologia descrita por Vaz et al. (1997).

Os cisticercos de *T. solium* foram cedidos pelo Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade do Estado de São Paulo, Pirassununga, SP.

3.3- EXTRATOS ANTIGÊNICOS

3.3.1- Antígenos de cisticercos de *T. crassiceps*

Foram utilizados três diferentes extratos antigênicos: líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* (**LV-Tcra**) (ESPINDOLA et al., 2002), proteínas de 18 e 14 kDa de LV-Tcra (**18/14**) (ESPINDOLA et al., 2005), e, excreção e secreção de cisticercos de *T. crassiceps* (**ES-Tcra**) (ESPINDOLA et al., 2002).

3.3.2- Antígenos de *T. solium*

Extratos antigênicos de *T. solium* foram utilizados, sendo o líquido vesicular de cisticercos de *T. solium* (**LV-Tso**) obtido por Espindola et al. (2005); total de cisticercos de *T. solium* (**T-Tso**) obtido por Espindola et al. (2002) e antígeno de escólex de *T. solium* (**E-Tso**) obtido por Bueno (1999).

3.3.3- Análise dos extratos antigênicos

Primeiramente fez-se a dosagem de proteína segundo Lowry et al. (1951) ou Micro BCA Protein Assay - Pierce®. Após este passo, os extratos antigênicos foram submetidos a SDS-PAGE e separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Os cálculos de mobilidade relativa e peso molecular foram calculados segundo Laemmli (1970).

3.4- AMOSTRAS UTILIZADAS

Foram utilizados soro hiperimune, anticorpos monoclonais e amostras de soros humanos.

3.4.1- Soro hiperimune anti-LV-Tcra

A obtenção do soro hiperimune anti-LV-Tcra em coelhos foi realizada por Pardini et al. (2001). Foram coletados soros antes da imunização (soro controle negativo) e

após a imunização (soro hiperimune anti-LV-Tcra).

3.4.2- Anticorpos monoclonais (AcMos)

Foram produzidos AcMos anti-*T. crassiceps* (anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra) e AcMos anti-*T. solium* (anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso) por Espindola et al. (2002). Informações prévias dos AcMos estão apresentadas na **tabela 4**.

Tabela 4- Características dos AcMos obtidos por Espindola et al. (2002): anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso.

AcMos	Clone	ELISA (reatividade)				isótipo	Imunoblot (kDa)	
		1	2	3	4		1	3
Anti-LV-Tcra	LV	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
Anti-ES-Tcra	ES	+	+	+	-	IgG2b	18 e 14-12	14-12
Anti-LV-Tso	G7	-	+	-	-	IgG1	-	14-12
	G12F7	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	C10	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	B6	+	+	-	-	IgG1	-	14-12
	A3	+	+	-	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	B4	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
Anti-T-Tso	A10		+	+	-	IgG1	-	14-12
	A5		+	+	-	IgG1	-	14-12
	F5	-	+	+	-	IgG2b	-	14-12
	G8	-	+	+	-	IgG1	-	14-12
	H12	-	-	+	+	IgG1	-	14-12
	A6	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
	B11	+	+	+	-	IgG1	18 e 14-12	14-12
Anti-E-Tso	H9	-	-	-	+	IgG1	-	45
	B8	-	-	+	+	IgG1	-	14-12
	C11	-	+	+	+	IgG1	-	94,75 e 45

Antígenos: LV-Tcra (1), LV-Tso (2), T-Tso (3) e E-Tso (4).

Presença de reatividade (+) ou ausência de reatividade (-) com os antígenos utilizados.

3.4.3- Soros humanos

Este estudo foi realizado 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 (BRASIL, 1996).

Um total de 225 soros foi utilizado para o estudo dos peptídeos sintéticos e distribuídos em diferentes grupos:

O grupo denominado de **“indivíduos supostamente saudáveis” (ISS)** foi constituído de 76 amostras de soros coletados 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. Os soros foram selecionados pela ausência de reatividade em ELISA utilizando o antígeno 18/14.

O grupo de 49 amostras de **“soros de pacientes com neurocisticercose” (NC)** foram cedidos pelo Prof Dr Luís dos Ramos Machado e Prof Dr José Antônio Livramento – Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo e Prof Dr Osvaldo Massaiti Takayanagui – Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Baseando-se nos critérios de diagnóstico da NC desenvolvidos por Del Brutto et al. (2001), todas as amostras de soros NC 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 TC ou RMN.

Os anticorpos presentes nas 49 amostras de soros NC reconheceram as proteínas de 18 e 14 kDa em Imunoblot utilizando antígeno LV-Tcra. Destas amostras, 39 eram de pacientes com sorologia positiva para anticorpos (ESPINDOLA et al. 2005) por teste ELISA utilizando o antígeno 18/14 e dez eram de pacientes que não apresentaram anticorpos anti-cisticercos detectados nessa coleta.

Sessenta e sete amostras de **“soros de pacientes com hidatidose”** foram utilizadas, sendo oito amostras provenientes de pacientes do Peru **(H-P)** e 59 amostras de pacientes do Rio Grande do Sul **(H-R)**, cedidas gentilmente pela Dra Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Todos os pacientes apresentaram exames de imagem confirmada para cisto hidático. Os soros foram selecionados pela ausência de reatividade em ELISA para pesquisa de anticorpos anti-cisticercos utilizando o antígeno 18/14.

Trinta e três amostras de soros de **“pacientes com outras parasitoses” (OP)** foram utilizadas neste estudo, sendo: 10 amostras de soros de pacientes com teníase, cedidas pelo Prof Dr Antônio Augusto Mendes Maia - Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga; 13 amostras de soros cedidas pela Dra Márcia Imans - UFSC: *Ascaris lumbricoides* (duas amostras), *Giardia lamblia* (uma amostra), *Strongyloides stercoralis* (seis amostras), *Schistosoma mansoni* (duas amostras) e *Entamoeba histolytica* (duas amostras) e 10 amostras de soros de pacientes com *Toxocara canis* cedidas pela Dra Guitta, Laboratório de Toxocaríase, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo. Todas as amostras de soros apresentaram

negatividade em ELISA para pesquisa de anticorpos anti-cisticercos utilizando o antígeno 18/14.

As características das amostras de soros humanos utilizados neste trabalho estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5- Número e positividade das amostras de soros humanos de pacientes com neurocisticercose (NC), indivíduos supostamente saudáveis (ISS), soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru (H-P) e do Rio Grande do Sul (H-R) e de pacientes com outras parasitoses (OP) em teste ELISA com antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* (ELISA 18/14) e Imunoblot com antígeno de LV-Tcra (Imunoblot LV-Tcra) utilizadas na análise dos peptídeos sintéticos.

AMOSTRAS	NÚMERO	ELISA 18/14	IMUNOBLLOT LV-Tcra
NC	49	39	49
ISS	76	0	0
H-P	08	0	0
H-R	59	0	0
OP	33	0	0

3.5- ESTUDO DA ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

O estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos foi realizado por teste ELISA utilizando soro hiperimune anti- LV-Tcra; AcMos anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* e amostras de soros humanos NC e ISS. Os valores de absorbância obtidos foram analisados, a fim de escolher o peptídeo isolado ou a utilização de múltiplos peptídeos antigênicos (MAP), ou seja, a mistura de diferentes peptídeos, que apresentassem a melhor reatividade com as amostras utilizadas.

3.5.1- Esquema do estudo da antigenicidade

Os peptídeos sintéticos foram avaliados frente a anticorpos de diversas procedências:

3.5.1.1- Soro hiperimune- A avaliação da antigenicidade dos peptídeos sintéticos P1a, P2a, P3a e P4a isolados ou MAPs foi analisada utilizando soro controle negativo (C-) e soro hiperimune anti-LV-Tcra (C+) diluídos a 1:50 (C- 1:50 e C+ 1:50) e a 1:200 (C+ 1:200). A análise foi baseada a partir da absorbância máxima apresentada com o soro controle negativo.

3.5.1.2- AcMos- Dezenove AcMos anti- *T. solium* e três AcMos anti- *T. crassiceps* foram submetidos em ELISA utilizando os peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b isolados. Os resultados de ELISA com LV-Tcra, 18/14 e T-Tso foram utilizados para comparação da antigenidade dos peptídeos sintéticos. O *cut off* de reatividade foi definido como 0,50 de absorbância.

3.5.1.3- Soros Humanos- Duas (utilizadas com P1a ou MAP) ou quatro amostras de soros NC e cinco ISS foram utilizadas para avaliação da antigenicidade dos peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b isolados ou MAPs sob diversas concentrações em ELISA. As amostras foram selecionadas pela presença (NC) ou ausência de relevante reatividade (ISS) em ELISA com 18/14. A análise da antigenicidade foi baseada a partir da absorbância máxima apresentada com os soros ISS.

3.6- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE

Após a avaliação da antigenicidade dos peptídeos sintéticos, foram realizados testes com “P1b” isolado e MAP com “P1a+P3a+P4a”, denominada de “MAP-a”. Variações nas concentrações de P1b (0,10 – 3,00 µg) e MAP-a (4,00 - 6,75 µg) foram previamente analisadas, sendo escolhido para “P1b”, 0,25 µg e para “MAP-a”, P1a e P3a a 2,50 µg de cada e 1,75 µg de P4a.

3.6.1- P1b - Para a avaliação da positividade e negatividade do teste ELISA com P1b para o sorodiagnóstico da cisticercose foram utilizadas 39 amostras de soros NC previamente selecionados pela reatividade em ELISA com 18/14 e 76 amostras de soros ISS. Paralelamente, P1b foi ensaiado com 10 amostras de soros NC não reativos para 18/14 em ELISA.

Para a análise da reatividade cruzada de P1b foram ensaiadas em ELISA, 59 amostras de soros H-R e oito amostras de soros H-P.

Amostras de soros OP também foram adicionados, sendo um total de 33 amostras de soros de pacientes com toxocaríase, teníase, strongyloidíase, ascaridíase, giardíase, amebíase ou esquistossomose.

3.6.2- MAP-a - Para a avaliação do ELISA com MAP-a foram utilizadas 26 amostras de soros NC reativos em ELISA com 18/14 e 73 amostras de soros ISS Paralelamente, cinco amostras de soros NC que apresentaram negatividade em ELISA com 18/14 foram ensaiados.

Para a análise da reatividade cruzada de MAP-a, oito amostras de soros H-P e 15 amostras H-R foram utilizadas.

Todas as amostras de soros utilizadas com MAP-a foram previamente ensaiadas com P1b

3.7- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.

Na tentativa de melhorar a positividade do ELISA com peptídeos sintéticos, o antígeno 18/14 (0,05 µg) foi adicionado aos peptídeos selecionados.

Inicialmente foram avaliados: “18/14+P1b” e “18/14+P1b+P3b+P4b”, sendo 18/14 a 0,05 µg e os peptídeos a 0,10 µg. Foram utilizadas 27 amostras de soros NC que apresentaram positividade em ELISA com 18/14, 30 amostras de soros ISS e 8 amostras de soros de pacientes com NC que não apresentaram reatividade em ELISA com 18/14.

3.8- PROTOCOLO DO ELISA COM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E/OU OUTROS ANTÍGENOS PARA PESQUISA DE ANTICORPOS

Inicialmente, o protocolo foi realizado segundo Gevorkian et al. (1996) com algumas modificações. As placas Costar® (Corning Inc., Cambridge, Mass.) foram sensibilizadas para o estudo da antigenicidade dos peptídeos com 5,00 µg dos peptídeos sintéticos isolados ou MAP em concentrações variáveis. Para a análise do desempenho do teste ELISA, P1b foi utilizado a 0,25 µg e MAP-a contendo P1a e

P3a a 2,50 µg/cada e P4a a 1,75 µg. O efeito da adição do antígeno 18/14 aos peptídeos sintéticos foi realizado com 18/14 a 0,05 µg e peptídeos a 0,10 µg. LV-Tcra (0,10 µg), T-Tso (1,00µg) e 18/14 (0,05 µg) foram utilizados como antígenos controles nos ensaios em andamento.

Condições de sensibilização, tempo de incubação, diluição, bloqueio e utilização do cromógeno foram previamente avaliadas.

A sensibilização da placa foi realizada em tampão carbonato/bicarbonato 0,50 M, pH 9,6 com uma quantidade suficiente para 100 µL. A incubação foi realizada por 16-18 horas a temperatura ambiente.

O bloqueio do teste ELISA foi realizado por 1 hora com 200 µL de solução de leite (Molico® desnatado) 5% em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Merck®, Schudart, Munich, Germany) (PBS-T), quando utilizados soro hiperimune e AcMos e por 2 horas com 300 µL de leite 1%, quando utilizadas amostras de soros humanos.

Adicionaram-se 100 µL da amostra previamente diluída em leite 1%, sendo em: diluição 1:50 e 1:200 para soro hiperimune, 1:50 para amostras de soros humanos e 1:200 para AcMos.

Foram adicionados 100 µL de conjugado anti-coelho-IgG-peroxidase (Sigma®), anti-camundongo-IgG-peroxidase (Sigma®) ou anti-humano-IgG-peroxidase (Bio Lab®) em diluições previamente padronizadas e diluídos em leite 1%.

A solução cromogênica foi composta de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), Merck®, Brasil e H₂O₂. A reação foi parada com solução de ácido sulfúrico 4N.

A cada etapa, as placas foram lavadas com cinco ciclos de PBS-T 0,05% em lavadora automática (Diagnostics Pasteur-LP 35, Straburg-Schiltigheim, France), exceto, após a sensibilização da placa para a qual não houve lavagem, quando utilizados peptídeos sintéticos e soros humanos.

A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SLT Spectra - SLT Labinstruments SA-5082-, Áustria) a 450 nm.

Para validar os resultados de comparação entre os diferentes testes com peptídeos sintéticos e amostras de soros humanos, foram utilizados controles positivos e negativos em relação à reatividade em ELISA com 18/14 e apenas foram aceitos os resultados, se os controles apresentassem absorbâncias de $>0,70$ e $0,10 - 0,20$, respectivamente. As amostras de soro hiperimune, soros humanos e AcMos foram ensaiadas em duplicatas e replicatas foram realizadas quando os valores de absorbância apresentaram diferença maior do que 20% entre os valores previamente obtidos nos ensaios.

Para a avaliação do desempenho dos peptídeos sintéticos utilizados isolados (P1b) ou em múltiplos peptídeos antigênicos (MAP-a) para o sorodiagnóstico da cisticercose foram propostos três diferentes *cut off* : a, b e TG-ROC. O “*cut off a*” foi baseado em um perfil de alta especificidade e analisado criteriosamente de forma que o ganho em especificidade não superasse a perda em sensibilidade do teste. O “*cut off b*” sugere uma especificidade e sensibilidade intermediária e o “*cut off TG-ROC*” (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995) com maior sensibilidade, sendo assim, considerado como triagem.

4- RESULTADOS

4.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

4.1.1- Análise do potencial hidrofílico da seqüência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T.crassiceps* (Gene Bank® gi 463900).

A análise realizada utilizando os algoritmos de Eisenberg et al. (1984) e Kyte e Doolittle (1982), indicaram duas regiões de maior potencial hidrofílico, a primeira situada entre os aminoácidos 20 a 50 e a segunda nas posições 70 a 80 da seqüência analisada. As regiões de maior potencial hidrofílico foram consideradas como potencialmente antigênicas e escolhidas para síntese dos peptídeos.

4.1.2- Análise da homologia da seqüência utilizada para síntese dos peptídeos comparada a outros seqüenciamentos.

As seqüências de aminoácidos utilizadas para as sínteses dos peptídeos possuem homologia com seqüências deduzidas por outros autores para *T. solium* e *T. crassiceps*. Os dados estão apresentados na **tabela 6 e 7**.

Tabela 6- Sequência de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps*, Gene Bank® gi 463900, e a homologia referente à porção comparada apresentada por outros autores utilizando seqüências de *T. crassiceps* e *T. solium*.

REF*	aa	SEQÜÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS																							aa		
P1a	1																								25		
P1b		L A I L V I T V V A A A P T D D D K K G																									
P4a																									R		
P4b		A A P T D D D P K K G																									
Zar		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	
Fis	..	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	
Esp																									R		
Per																											
Fer		M	K	A	S	I	F	L	A	L	A	I	L	V	I	T	V	V	A	V	P	A	D	D	K	G	
Chu		M	R	A	S	I	F	L	A	V	A	I	L	V	I	T	V	V	A	A	P	D	D	D	K	G	
Gre14		M	R	A	Y	I	V	L	L	A	L	T	V	F	V	V	T	V	S	A	E	K	N	K	P	K	
Gre18																											
Jim		M	V	R	V	N	V	L	A	D	A	L	K	S	I	N	N	A	E	R	R	K	K	R	Q	V	
P1a	26	P	E	D	L	K	K	K	M	M	K	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	50
P1b		P	E	D	L	K	K	K	M	M	K	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	
P2a																											
P4a		V	I	D	L	K	K																				
P4b		V	E	D	T	Y	P	Y	Q	A	P	T	D	D	K	R	V	I	D	L	K	K					
Zar		P	E	D	L	K	K	K	M	M	K	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	
Fis		P	E	D	L	K	K	K	M	M	K	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	
Esp		V	I	D	L	K	K																				
Per		V	E	D	T	Y	P	Y	Q																		
Fer		Q	E	D	L	K	K	K	M	M	K	H	L	G	E	V	R	R	F	F	R	E	D	P	L	G	
Chu		Q	E	D	L	N	M	T	V	M	L	Q	L	G	E	V	R	R	F	F	T	E	D	P	L	G	
Gre14		D	V	A	N	S	T	K	K	G	I	E	Y	V	H	E	F	F	H	E	D	P	I	G	K	Q	
Gre18		C	D	A	N	S	T	K	K	E	I	E	Y	I	H	N	F	F	H	D	D	P	I	G	K	Q	
Jim		M	I	R	P	C	S	K	V	I	V	R	F	L	K	V	M	Q	R	K	G	Y	I	G	E	F	
P3a	51																								75		
P3b																											
P4b																											
Zar		Q	K	I	I	D	E	F	Q	E	T	V	S	I	C	K	A	I	R	E	R	I	R	K	R	L	
Fis		Q	K	I	I	D	H	F	Q	E	T	V	S	I	C	K	A	I	R	E	R	I	R	K	R	L	
Fer		Q	K	I	I	D	Q	F	Q	E	M	I	S	I	A	K	A	I	R	Q	R	I	R	K	R	L	
Chu		R	N	V	T	K	Q	L	K	E	M	I	A	I	A	K	V	I	P	H	R	I	R	K	C	L	
Gre14		I	A	Q	L	A	K	E	W	K	E	A	M	L	E	D	K	G	K	I	R	T	S	L	V	E	
Gre18		I	A	Q	L	A	K	D	W	N	E	T	V	Q	E	A	K	G	K	F	W	A	S	L	A	E	
Jim		E	V	V	D	D	H	R	S	G	K	I	I	V	Q	L	N	G	R	L	N	K	C	G	V	I	
P3a	76	G	E	Y	L	K																		100			
P3b		G	E	Y	L	K	G	L																			
Zar		G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E																
Fis		G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E																
Fer		G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E																
Chu		G	E	Y	L	K	G	L	E	N	E																
Gre14		H	C	K	G	P	K	K	K	T	A																
Gre18		Y	C	R	G	L	K	N	K	T	A																
Jim		S	P	R	F	K	M	G	V	R	D	..															

REF*: (Zar) proteína de 10 kDa descrita por Zarlenga et al., disponível no Gene Bank® (gi 463900); (Fis) proteína recombinante TcMet-1 e TcMet-2 descritas por Fischer et al. (1994); (Esp) proteínas de 18 e 14 kDa descritas por Espindola (2004); (Per) proteína de 14 kDa descrita por Peralta et al. (2002); (Fer) antígeno m13h de baixo peso molecular de excreção e secreção descrito por Ferrer et al., disponível no Gene Bank® (gi 24940275); (Chu) antígeno de 10 kDa (TsM) descrito por Chung et al. (1999); (Gre14) recombinantes TS14 e (Gre18) TS18 descritos por Greene et al. (2000); e (Jim) proteína recombinante (TsS15a) descrita por Jimenez, Landa e Becerra (2004).

Dados em azul referentes à homologia com a proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (Zar)

(..) continuação do seqüenciamento não apresentado.

Seqüências de *T. crassiceps*: Zar, Fis, Esp, Per e seqüências de *T. solium*: Fer, Chu, Gre14, Gre18 e Jim.

aa: alinhamento dos aminoácidos de 1-100 presentes nas seqüências apresentadas.

Tabela 7- Homologia dos peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b comparada a porções das seqüências de aminoácidos das proteínas de *T.solium* e de *T.crassiceps* apresentadas por outros autores.

REF*	PEPTÍDEOS SINTÉTICOS						
	P1a	P1b	P2a	P3a	P3b	P4a	P4b (Porção não presente em P4a)
Zar	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	93,8%	76,9%	46,7%
Fis	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	93,8%	76,9%	46,7%
Esp	---	---	---	---	---	100,0%	40,0%
Per	---	---	---	---	---	53,8%	93,3%
Fer	93,1%	90,5%	92,3%	100,0%	87,5%	61,5%	40,0%
Chu	72,9%	78,6%	61,5%	90,9%	87,5%	53,8%	46,7%
Gre14	3,4%	7,1%	7,7%	9,1%	6,3%	7,7%	6,7%
Gre18	3,4%	---	7,7%	0,0%	0,0%	7,7%	6,7%
Jim	6,9%	9,5%	15,4%	9,1%	6,3%	7,7%	0,0%

REF*: (**Zar**) proteína de 10 kDa descrita por Zarlenga et al., disponível no Gene Bank® (gi 463900); (**Fis**) proteína recombinante TcMet-1 e TcMet-2 descritas por Fischer et al. (1994); (**Esp**) proteínas de 18 e 14 kDa descritas por Espindola (2004); (**Per**) proteína de 14 kDa descrita por Peralta et al. (2002); (**Fer**) antígeno m13h de baixo peso molecular de excreção e secreção descrito por Ferrer et al., disponível no Gene Bank® (gi 24940275); (**Chu**) antígeno de 10 kDa (TsM) descrito por Chung et al. (1999); (**Gre14**) recombinantes TS14 e (**Gre18**) TS18 descritos por Greene et al. (2000); e (**Jim**) proteína recombinante (TsS15a) descrita por Jimenez, Landa e Becerra (2004).

---: seqüências de aminoácidos não comparadas

Seqüências de *T. crassiceps*: Zar, Fis, Esp, Per e seqüências de *T.solium*: Fer, Chu, Gre14, Gre18 e Jim.

4.2- ESTUDO DA ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

4.2.1- Utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra

Na **figura 8** estão demonstrados os valores de absorbâncias obtidos em ELISA para pesquisa de anticorpos utilizando os peptídeos P1a, P2a, P3a ou P4a isolados e MAPs.

A **B**

Figura 8- Absorbâncias obtidas em ELISA com os peptídeos sintéticos, sendo **A:** Valores com P1a, P2a, P3a ou P4a (5,00 µg/poço) utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra (C+ 1:50) e soro controle negativo (C-1:50) diluídos a 1:50 e **B:** Valores com MAP contendo dois (0,50 µg de cada/poço); três (1,50 µg de cada/poço) ou quatro peptídeos sintéticos (1,00 µg de cada/poço) utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra diluído a 1:50 (C+1:50) e soro controle negativo diluído a 1:50 (C- 1:50). Também foram realizados ensaios dos mesmos soros com antígeno LV-Tcra a 0,10 µg/poço e 18/14 a 0,05 µg/poço.

Os peptídeos sintéticos P1a e P4a apresentaram relevante reatividade com soro hiperimune anti-LV-Tcra, demonstrando diferença de absorbância de pelo menos quatro vezes quando comparada ao soro controle negativo. P2a e P3a apresentaram baixa antigenicidade.

Ao analisar os MAPs, nota-se que combinações contendo P1a apresentaram diferença de absorbância entre o soro hiperimune anti-LV-Tcra e soro controle negativo, diluídos 1:50, de pelo menos quatro vezes, sendo os MAPs, em ordem decrescente de reatividade: “P1a+P2a+P3a+P4a”, “P1a+P3a+P4a”, “P1a+P2a+P4a”, “P1a+P4a”, “P1a+P3a” e “P1a+P2a”.

MAPs contendo P4a, porém sem P1a, não apresentaram diferença de absorbância de pelo menos duas vezes entre os soros controles, exceto “P3a+P4a”, em que a diferença de absorbância foi maior do que quatro vezes. Assim, aparentemente estes MAPs são menos antigênicos do que aqueles contendo P1a.

MAPs contendo apenas P2a e P3a não apresentaram reatividade.

Ao utilizar os MAPs com soro hiperimune anti-LV-Tcra diluído a 1:200, “P1a+P3a+P4a” e “P1a+P2a+P3a+P4a” foram os que melhor distinguiram os soros controles positivo e negativo, apresentando diferença de absorbância de pelo menos duas vezes.

A antigenicidade apresentada por LV-Tcra e por 18/14 foi maior que a demonstrada nos ensaios com os peptídeos isolados ou MAPs.

4.2.2 - Utilizando AcMos anti- *T. solium* e anti-*T. crassiceps*.

Os peptídeos “a” e “b” foram analisados utilizando AcMos anti-*T. crassiceps* (anti-ES-Tcra e anti-LV-Tcra) e AcMos anti-*T. solium* (anti-T-Tso, anti-LV-Tso e anti-E-

Tso). Antígenos T-Tso, 18/14 e LV-Tcra foram utilizados para comparação da reatividade observada.

Na **tabela 8** estão dispostos os resultados das absorvâncias obtidas em ELISA com os peptídeos sintéticos e antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps* utilizando AcMos.

Tabela 8- Absorvâncias obtidas em ELISA utilizando os peptídeos sintéticos P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a e P4b (5,00 µg/poço), antígeno LV-Tcra (0,10 µg/poço), 18/14 (0,05 µg/poço) e T-Tso (1,00 µg/poço) com AcMos anti-*T. solium* e anti-*T. crassiceps*. Considerado *cut off* de 0,50 de absorvância para análise dos resultados.

AcMos	CLONE	ANTÍGENOS									
		P1a	P1b	P2a	P3a	P3b	P4a	P4b	LV-Tcra	T-Tso	18/14
Anti-LV-Tcra	LV	3,18	3,22	0,46	0,23	0,17	0,15	0,27	2,79	0,97	3,05
Anti-ES-Tcra	Ascite	3,03	3,19	0,11	0,16	0,11	0,09	0,14	2,94	0,98	2,46
	Meio *	3,18	3,25	0,7	0,52	0,18	0,15	0,23	2,86	1,2	2,43
Anti-LV-Tso	G7	0,08	0,63	0,08	0,06	0,08	0,06	0,1	0,25	0,45	0,37
	G12F7	0,37	1,45	0,09	0,07	0,08	0,07	0,09	0,84	0,4	1,27
	C10	1,94	2,82	0,08	0,06	0,07	0,05	0,09	1,47	0,41	1,33
	B6	1,21	1,66	0,12	0,08	0,07	0,06	0,11	1,19	0,37	2,03
	A3*	0,46	1,51	0,07	0,08	0,07	0,07	0,09	1,66	0,54	2,42
	A3	2,55	3,18	0,12	0,13	0,1	0,08	0,12	1,87	0,63	2,07
Anti-T-Tso	B4	2,25	1,88	0,09	0,11	0,07	0,07	0,1	1,74	1,48	1,98
	A10	0,24	0,71	0,09	0,08	0,07	0,06	0,08	0,43	0,68	0,63
	A5	0,06	0,51	0,08	0,07	0,07	0,06	0,08	0,19	0,56	0,34
	F5	0,06	0,42	0,12	0,08	0,07	0,07	0,08	0,17	1,17	0,27
	G8	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,06	0,08	0,17	0,63	0,29
	H12	0,06	0,12	0,06	0,06	0,06	0,05	0,08	0,24	0,67	0,3
	B11*	0,37	2,63	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	1,57	0,24	1,61
	Tso clonado	3,17	3,16	1,76	0,69	0,08	0,12	0,11	2,63	2,16	2,39
	A6	2,89	2,96	0,08	0,11	0,08	0,09	0,1	2,13	0,9	2,45
	B11	0,56	0,73	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	1,60	0,31	2,01
Anti-E-Tso	H9	0,06	0,25	0,08	0,08	0,07	0,06	0,09	0,19	0,59	0,31
	B8	0,06	0,29	0,08	0,06	0,08	0,06	0,1	0,20	1,18	0,31
	C11	0,07	0,25	0,08	0,07	0,07	0,06	0,11	0,80	0,75	0,41

* AcMos obtidos por expansão em meio de cultura, sendo os demais, obtidos por expansão em ascite peritoneal. Dados em itálico vermelho, reatividade significativa com AcMos anti-*T. crassiceps* ou anti-*T. solium*.

Conforme os dados apresentados na tabela 8, assumindo um *cut off* de 0,50 para a comparação de antigenicidade dos peptídeos sintéticos estudados, têm-se para os peptídeos sintéticos:

P1a apresentou reatividade com dez (45,5%) dos 22 AcMos utilizados, sendo os três (100,0%) AcMos anti-*T. crassiceps* e sete (36,8%) AcMos anti-*T. solium* (quatro AcMos anti-T-Tso e três AcMos anti-LV-Tso). Não houve reatividade utilizando AcMos anti-E-Tso.

Os dez AcMos que reconheceram P1a também apresentaram reatividade com os antígenos LV-Tcra e 18/14, e sete deles eram reativos com o antígeno T-Tso.

P1b apresentou reatividade com os mesmos dez AcMos que reconheceram P1a e adicionalmente com mais seis AcMos anti-*T. solium*, totalizando 16 (72,7%) AcMos, sendo três (100,0%) anti-*T. crassiceps* e 13 (68,4%) anti-*T. solium*.

Dos 16 AcMos que apresentaram reatividade com P1b, 13 destes também foram reativos com o antígeno LV-Tcra, 14 com o antígeno 18/14 e dez com o antígeno T-Tso.

P2a e P3a apresentaram reatividade com apenas um (33,3%) AcMo anti-*T. crassiceps* e um (5,3%) AcMo anti-*T. solium*, sendo que estes AcMos também reconheceram os antígenos LV-Tcra, T-Tso e 18/14.

Para **P3b, P4a e P4b** não houve reatividade em relação aos AcMos.

4.2.3- Utilizando amostras de soros humanos

O estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos foi realizado com ELISA utilizando os peptídeos isolados e MAPs com soros de pacientes com NC e ISS.

Foram ensaiados peptídeos sintéticos isolados e variações de concentração dos MAPs em ELISA com soros humanos. Os resultados de melhor reatividade foram selecionados e apresentados na **figura 9**.

A

B

Figura 9- Absorbâncias obtidas em ELISA com peptídeos sintéticos, utilizando dois (utilizados com P1a ou MAP) ou quatro soros de pacientes com neurocisticercose (dados em vermelho) e cinco soros de indivíduos supostamente saudáveis (dados em preto). **A:** Valores com peptídeos sintéticos isolados P1a, P1b, P2a, P3a, P3b, P4a ou P4b (5,00 µg/poço) e **B:** Valores com MAPs, P1a+P4a (2,00 µg de cada/poço), P1b+P3b (0,25 µg de cada/poço), P1b+P4b (0,25 µg de cada/poço), P1a+P2a+P4a (2,25 µg de cada/poço), P1a+P3a+P4a (2,25 µg de cada/poço), P1b+P3b+P4b (0,25 µg de cada/poço), P2a+P3a+P4a (2,25 µg de cada/poço) e P1a+P2a+P3a+P4a (1,50 µg de cada/poço).

Analisando a antigenicidade dos peptídeos isolados, com P1b foi possível distinguir os soros de pacientes com NC dos soros ISS, e, com P1a, o valor de absorbância de um dos soros de pacientes com NC apresentou-se próximo aos valores obtidos com os soros ISS. Os demais peptídeos não apresentaram antigenicidade com os soros humanos.

Os MAPs que demonstraram alguma distinção entre os soros de pacientes com NC e ISS, ou seja, média da diferença de reatividade entre os soros de pacientes com NC e ISS, de pelo menos duas vezes, foram: “P1a+P3a+P4a”, “P1a+P2a+P4a”, “P1a+P2a+P3a+P4a” e “P1b+P3b+P4b”.

Demais MAPs utilizando os peptídeos “a” e “b” foram ensaiados (dados não mostrados), porém, não apresentaram maior antigenicidade do que os apresentados neste trabalho.

Os resultados do estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra, AcMo anti-*T. crassiceps* e anti *T. solium* e amostras de soros humanos estão reunidos na **tabela 9**.

TABELA 9- Positividade do teste ELISA para o estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos isolados e MAPs utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra (C+1:50 e 1:200) e soro controle negativo (C-1:50), três anticorpos monoclonais (AcMo) anti-*T. crassiceps* e 19 anti-*T. solium* e duas (P1a e MAPs) ou quatro amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC).

PEPTÍDEOS ISOLADOS	AMOSTRAS				
	SORO HIPERIMUNE ANTI-LV-Tcra		AcMos		SOROS HUMANOS
	C+1:50	C+1:200	Anti- <i>T.crassiceps</i>	Anti- <i>T.solium</i>	NC
	(C+1:50/C-1:50)	(C+1:200/C-1:50)	(n° de AcMos reativos- total AcMos)	(n° de AcMos reativos- total AcMos)	(n° de soros NC reativos-total NC)
P1a	>4x	---	3-3	7-19	2-2
P1b	---	---	3-3	13-19	4-4
P2a	N	---	1-3	1-19	1-4
P3a	N	---	1-3	1-19	N
P3b	---	---	N	N	1-4
P4a	>4x	---	N	N	1-4
P4b	---	---	N	N	N
MAPs					
P1a+P2a	>4x	N	---	---	---
P1a+P3a	>4x	N	---	---	---
P1a+P4a	>4x	N	---	---	2-2
P2a+P3a	N	N	---	---	---
P2a+P4a	N	N	---	---	---
P3a+P4a	>4x	N	---	---	---
P1a+P2a+P4a	>4x	N	---	---	2-2
P1a+P3a+P4a	>4x	>2x	---	---	2-2
P2a+P3a+P4a	N	N	---	---	N
P1a+P2a+P3a +P4a	>4x	>2x	---	---	2-2
P1b+P3b	---	---	---	---	2-2
P1b+P4b	---	---	---	---	1-2
P1b+P3b+P4b	---	---	---	---	2-2

*A positividade do teste ELISA utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra foi expressa pelo valor de absorbância apresentado pelo C+ dividido pelo valor de absorbância apresentado pelo C-, sendo >4x e >2x a diferença de reatividade apresentada pelo C+ maior do que quatro ou duas vezes, respectivamente.

N: A diferença de reatividade entre o C- e C+ menor do que 2X (soro hiperimune) ou ausência de reatividade (AcMos e amostras de soros humanos).

---: Ensaios não realizados

Dados apresentados em azul correspondem à ausência de reatividade e dados em negrito vermelho à presença de reatividade.

4.3- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE

Para a avaliação do ELISA com peptídeos sintéticos foram realizados testes com P1b e MAP-a. As concentrações de peptídeos utilizadas foram previamente padronizadas, para “P1b”, 0,25 µg e para MAP-a, 2,50 µg de P1a, 2,50 µg de P3a e 1,75 µg de P4a por poço.

Os resultados de absorbância apresentados em ELISA com P1b e MAP-a utilizando amostras de soros de pacientes com NC, indivíduos supostamente saudáveis, pacientes com hidatidose e com outras parasitoses estão demonstrados na **figura 10**.

A **B**

--- Valor de *cut off* calculado em curva TG-ROC (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995).

Figura 10- Absorbâncias obtidas em ELISA com P1b (0,25 µg/poço) ou MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada e P4a a 1,75 µg/poço) utilizando amostras de soros humanos, sendo respectivamente: **A:** 39 ou 26 amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC) e 76 ou 73 de indivíduos supostamente saudáveis (ISS). **B:** ELISA com P1b, 33 amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (OP), 59 de pacientes com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul (H-R) e oito de pacientes com hidatidose provindos do Peru (H-P). Em paralelo, ELISA com MAP-a, 15 H-R e 8 H-P.

Paralelamente, ELISA com P1b foi ensaiado com 10 amostras de soros de pacientes com NC que não apresentavam reatividade em ELISA com 18/14, sendo que seis amostras apresentaram valores de absorbância entre 0,05-0,20, três entre 0,20-0,30 e uma acima de 0,40.

Cinco amostras de soros de pacientes com NC que não apresentaram reatividade em ELISA com 18/14 foram utilizadas em ELISA com MAP-a. Duas amostras apresentaram valores de absorbância entre 0,15-0,25, duas entre 0,25-0,35 e uma acima de 0,40.

A fim de otimizar a análise do desempenho dos testes realizados, diferentes valores de *cut off* foram calculados para ELISA com P1b e MAP-a e apresentados na **tabela 10**.

Tabela 10- Positividade do teste ELISA com P1b (0,25 µg/poço) ou MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada e P4a a 1,75 µg/poço) e amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC), supostamente saudáveis (ISS), com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul (H-R) ou do Peru (H-P) e com outras parasitoses (OP).

AMOSTRAS	ELISA	n	Cut off			
			a	b	TG-ROC*	18/14
NC	P1b	39	59,0% (44,0-74,0%)	69,2% (54,2-84,2%)	79,5% (67,0-93,0%)	100,0% (69,0-100,0%)
	MAP-a	26	57,7% (38,7-76,7%)	73,1% (56,1-90,1%)	92,3% (82,3-100,0%)	100% (61,6-100,0%)
ISS	P1b	76	1,3% (0,0-3,5%)	2,6% (0,0-6,4%)	11,8% (6,0-19,0%)	0,0% (0,0-0,7%)
	MAP-a	73	1,4% (0,0-3,7%)	5,5% (0,0-10,0%)	9,6% (3,0-17,0%)	0,0% (0,0-0,7%)
H-R	P1b	59	3,4% (0,0-7,8%)	5,1% (0,0-10,7%)	10,2% (2,0-18,0%)	0,0% (0,0-0,8%)
	MAP-a	15	0,0% (0,0-1,6%)	0,0% (0,0-1,6%)	13,3% (0,0-30,0%)	0,0% (0,0-1,6%)
H-P	P1b	08	0,0% (0,0-2,2%)	12,5% (0,0-35,8%)	50,0% (15,0-85,0%)	0,0% (0,0-2,2%)
	MAP-a	08	12,5% (0,0-35,8%)	25,0% (0,0-55,0%)	37,5% (4,0-72,0%)	0,0% (0,0-2,2%)
OP	P1b	33	0,0% (0,0-1,1%)	6,1% (0,0-14,2%)	9,1% (0,0-19,0%)	0,0% (0,0-1,1%)
	MAP-a	00	-----	-----	-----	-----

n=número de amostras de soros utilizadas

*Valores de *cut off* calculados em curva TG-ROC (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995)

Valores de *cut off* para P1b: 0,260 (a); 0,200 (b) e 0,152 (TG-ROC). Valores de *cut off* para MAP-a: 0,350 (a); 0,230 (b) e 0,209 (TG-ROC)

18/14: Positividade em ELISA com 18/14

Dados de intervalo de confiança apresentados entre parênteses.

Dados em negrito representam a porcentagem de positividade que possibilitaram a melhor diferenciação das amostras de soros utilizadas nos ensaios.

-----: ensaio não realizado

4.3.1- P1b

Os índices de positividade demonstrados em ELISA com P1b e amostras de pacientes com NC, variaram de 59,0 - 79,5% e utilizando amostras de soros ISS, variaram de 1,3-11,8%, dependendo do *cut off* selecionado.

Maiores valores de positividade foram demonstrados com as amostras de pacientes com hidatidose provindos do Peru (0,0-50,0%) em relação às amostras provindas do Rio Grande do Sul (3,4-10,2%).

ELISA com P1b e soros de pacientes com outras parasitoses, apresentou índice de positividade de 0,0-9,1%, especialmente com strongyloidíase, toxocaríase e amebíase. Não houve reatividade com soros de pacientes com teníase, ascaridíase, giardíase e esquistossomose.

4.3.2- MAP-a

Os índices de positividade demonstrados em ELISA com MAP-a e amostras de pacientes com NC, variaram de 57,7-92,3% e utilizando amostras de soros ISS, variaram de 1,4-9,6%, dependendo do *cut off* selecionado.

ELISA com MAP-a e amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru apresentou positividade de 12,5-37,5%, sendo que utilizando amostras de soros de pacientes provindos do Rio Grande do Sul, variou entre 0,0-13,3%.

4.4- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Na tentativa de aumentar a sensibilidade do teste utilizando peptídeos sintéticos, foram analisados MAPs acrescidos do antígeno 18/14. Para o ensaio foram utilizadas amostras de soros de pacientes com NC e ISS.

Na **figura 11** estão demonstrados os valores de absorbância obtidos em ELISA com adição de 18/14 aos peptídeos sintéticos P1b, P3b e P4b e soros humanos.

Figura 11- Absorbâncias obtidas em ELISA com a adição do antígeno 18/14 (0,05µg/poço) aos peptídeos sintéticos (P1b, P3b e P4b a 0,10µg de cada/poço), utilizando 27 soros de pacientes com neurocisticercose reativos em ELISA com 18/14 (NC1), 8 não reativos (NC2) e 30 soros de indivíduos supostamente saudáveis (ISS).

A distribuição dos resultados obtida para os três grupos de soros, mostrou que a adição de peptídeos reduz a antigenicidade do antígeno 18/14 frente aos anticorpos presentes nos soros de pacientes com NC.

A adição do antígeno 18/14 aos peptídeos sintéticos em ELISA utilizando soros de pacientes com NC que não apresentaram reatividade ao antígeno 18/14, não demonstrou uma maior antigenidade ao complexo antigênico, quando comparado ao *cut off* calculado pela curva TG-ROC (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995).

Para a análise da positividade dos diferentes antígenos utilizados em ELISA, na **tabela 11** estão os resultados de positividade dos mesmos soros humanos NC e ISS utilizados em ELISA com P1b, MAP-a, 18/14+P1b e 18/14+P1b+P3b+P4b.

Tabela 11- Positividade do teste ELISA com P1b, MAP-a (P1a e P3a a 2,50 µg de cada e P4a a 1,75 µg/poço), 18/14+P1b e 18/14+P1b+P3b+P4b utilizando as mesmas amostras de soros de pacientes com neurocisticercose (NC 1 e 2) e de indivíduos supostamente saudáveis (ISS). Peptídeos sintéticos a 0,10 µg/poço e 18/14 a 0,05 µg/poço.

AMOSTRA	ELISA	n	Cut off		
			a	b	TG-ROC*
NC 1	P1b	17	64,7% (36,7-92,7%)	70,6% (49,6-91,6%)	70,6% (49,6-91,6%)
	MAP-a	17	58,9% (35,9-81,9%)	64,7% (41,7-87,7%)	88,2% (73,2-100,0%)
	18/14+P1b	17	---	---	94,1%
	18/14+P1b+P3b+P4b	17	---	---	88,2% (73,2-100,0%)
NC 2	P1b	04	50,0% (1,0%-99,0%)	50,0% (1,0%-99,0%)	75,0% (33,0-100,0%)
	MAP-a	04	50,0% (1,0%-99,0%)	50,0% (1,0%-99,0%)	75,0% (33,0-100,0%)
	18/14+P1b	04	---	---	75,0% (33,0-100,0%)
	18/14+P1b+P3b+P4b	04	---	---	---
ISS	P1b	30	0,0% (0,0-1,1%)	6,7% (0,0-15,8%)	10,0% (0,0-21,0%)
	MAP-a	30	3,3% (0,0-9,4%)	10,0% (0,0-21,0%)	5,0% (0,0-12,8%)
	18/14+P1b	30	---	---	26,7% (10,8-42,6%)
	18/14+P1b+P3b+P4b	30	---	---	10,0% (0,0-21,0%)

n=número de amostras de soros utilizadas. Foram utilizadas amostras de soros de pacientes com neurocisticercose que apresentaram (NC 1) ou não (NC 2) reatividade em ELISA com 18/14

*Valores de *cut off* calculados em curva TG-ROC (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995).

Valores de *cut off* para P1b: 0,260 (a); 0,200 (b) e 0,152 (TG-ROC). Valores de *cut off* para MAP-a: 0,350 (a); 0,230 (b) e 0,209 (TG-ROC). Valores de *cut off* para P1b+18/14: 0,157 (TG-ROC) e para 18/14+P1b+P3b+P4b: 0,177 (TG-ROC). Dados de intervalo de confiança apresentados entre parênteses.

---: ensaio não realizado.

5- DISCUSSÃO

A padronização de testes imunológicos alternativos para a utilização no 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 envolvida, mas, pelos fatores de riscos associados com a transmissão, que são crescentes (NOYA et al., 2003).

Nossa equipe, ao longo dos anos, vem desenvolvendo o diagnóstico laboratorial da NC com base em antígenos brutos e purificados de *T. crassiceps* (BUENO et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2005). Como vantagens 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 no processo (ESPINDOLA et al., 2005), tornando a utilização de peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes, um importante objeto de estudo.

5.1- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Inicialmente, cDNA de *T. crassiceps* (gi 463900) foi selecionado como base principal das seqüências de aminoácidos dos peptídeos a serem sintetizados, visto que diversos autores já assumiram que antígenos de *T. crassiceps* podem efetivamente substituir os de *T. solium* (LARRALDE et al., 1990; VAZ et al., 1997). A presença de epítomos comuns entre as espécies de *T. solium*, *T. saginata* e *T. crassiceps*, possibilita a exploração das seqüências de aminoácidos para o diagnóstico da cisticercose humana (BUENO et al., 2005), suína (SATO et al., 2003) e até mesmo, bovina (FERRER et al., 2003).

Para os ensaios, a análise do potencial hidrofílico das seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* realizada por dois algoritmos, Eisenberg et al. (1984) e Kyte e Doolittle (1982), foram pontos importantes para a seleção das frações antigênicas utilizadas. A análise da estrutura secundária e terciária das proteínas, baseando-se no caráter hidrofóbico da seqüência de aminoácidos, já foi utilizada por outros autores e considerada um eficiente método de comparação de proteínas (CHAMEKH et al., 1992).

As seqüências de aminoácidos selecionadas para a síntese dos peptídeos P1a, P1b, P2a, P3a e P3b apresentaram de 93,8-100,0% de homologia quando comparadas a seqüências de aminoácidos da proteína de 10 kDa de *T. crassiceps* (FISCHER et al., 1994; ZARLENGA et al., gi 463900) e 61,5-100,0% quando comparadas a seqüências de aminoácidos de baixo peso molecular de *T. solium* descritas por Ferrer et al. (gi 24940275) e Chung et al. (1999) (tabelas 6 e 7), os peptídeos seriam específicos para o diagnóstico da NC, relacionados possivelmente, com as proteínas de baixo peso molecular de *T. crassiceps*, especialmente com as de 18 e 14 kDa (ESPINDOLA et al., 2005; PERALTA et al., 2002) e as de *T. solium*, 10-26 kDa, (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; YANG et al., 1998).

As porções que compõem P4b apresentaram entre 46,7-100,0% de homologia com seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* e 0,0-61,5% com seqüências de *T. solium*. Esta baixa homologia, não faz destes peptídeos incompetentes para o imunodiagnóstico, mas, ressalta a importância da análise das proteínas de baixo peso molecular em condições diversas, visto às limitações demonstradas pelas próprias técnicas de seqüenciamentos utilizadas.

Os aminoácidos divergentes presentes entre os seqüenciamentos das proteínas de *T. crassiceps* e *T. solium* podem ser explorados na síntese de outros peptídeos

para a análise da antigenicidade, visto que a mudança de posição dos aminoácidos ou a inclusão de outros, podem interferir na estabilidade e conformação da proteína (KOHN; KAY; HODGES, 1998).

Para a síntese dos peptídeos utilizados neste trabalho, escolheu-se a técnica de síntese química, devido à possibilidade de automação, maior praticidade, rapidez e capacidade de introdução de aminoácidos de forma aleatória. Alguns inconvenientes também podem ser citados, como, a racemização dos doadores de acila quando na sua ativação e acoplamento, agregação das cadeias peptídicas em crescimento, reações secundárias e baixo rendimento na obtenção de peptídeos longos que possuam mais do que 25 resíduos de aminoácidos, como os peptídeos P1b e P4b (MACHADO et al., 2004).

5.2- ANTIGENICIDADE DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Não há um padrão de reatividade em relação ao tamanho de estrutura primária dos peptídeos sintéticos, pois, cadeias pequenas, com menos de 10 aminoácidos podem ser pouco reconhecidas, pelo seu tamanho e pela dificuldade de adesão à placa de ELISA (HERNANDEZ et al., 2006), enquanto, que em cadeias longas, podem ocorrer dificuldades para a organização helical, com inúmeras ligações secundárias (CHAMEKH et al., 1992).

Os aminoácidos lisina e arginina, praticamente não são encontrados em regiões transmembrana (POETSCH et al., 2003), e por isso, a presença dos mesmos, em uma seqüência de aminoácidos, pode sugerir um potencial antigênico à fração. Assim, inicialmente, todos os peptídeos possuíam potencial para serem utilizados no diagnóstico da cisticercose, apresentando 11,9-30,8% de lisina (tabela 3).

A antigenicidade dos peptídeos sintéticos não depende apenas da seqüência de aminoácidos selecionada. Chong et al. (1998), ressalta a importância das interações entre os resíduos polares na estabilidade e conformação da proteína, enquanto que Horovitz et al. (1990) salienta que pares de íons contribuem mais para a estabilidade da proteína que íons isolados. Assim, para estipular o antígeno ideal, o estudo da estrutura-atividade deveria ser integrado, porém, o alto custo da síntese dos peptídeos torna esta prática ainda inviável.

As proteínas presentes em cisticercos de *T. crassiceps* e *T. solium* são, na realidade, glicoproteínas. Portanto, os resíduos de açúcares presentes entre as seqüências de aminoácidos também são importantes na estrutura antigênica dos epítomos, contudo, a introdução destes resíduos na síntese de peptídeos torna-se mais difícil o processo (CORREA et al., 2000).

Alguns autores já comentaram sobre a possibilidade de conjugação dos peptídeos sintéticos a uma proteína inerte, como a albumina, para que desta forma se possa aumentar a reatividade das pequenas frações antigênicas nos ensaios (GONZALES-SAPIENZA; LORENZO; NIETO, 2000). Porém, estudos mostraram que resultados semelhantes foram obtidos quando comparados os peptídeos conjugados com os peptídeos não conjugados (FLEURY et al., 2003; WOOLARD; GAUCI; LIGTOWLERS, 1999). Neste estudo, este procedimento não foi realizado, visto o alto custo envolvido.

5.2.1- Utilizando soro hiperimune

O estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos “a”, utilizando soro hiperimune anti-LV-Tcra, apontou os peptídeos P1a e P4a como sendo os mais antigênicos (figura 8-a), mostrando que eles poderiam representar epítomos imunodominantes presentes em líquido vesicular de *T. crassiceps* (HERNANDEZ et al., 2000). Ambos os peptídeos possuem PI muito próximos, respectivamente, 8,38 e 8,54 e apresenta radicais carregados positivamente e negativamente praticamente equivalentes, enquanto que P2a e P3a, apresentaram PI de 11,2 e 11,0 (tabela 3), além de predomínio de radicais de aminoácidos carregados positivamente, sugerindo, que a carga final interferiu na adesão à placa de ELISA e reconhecimento dos anticorpos.

Não houve reatividade em ensaios contendo MAPs com três peptídeos, sendo presente P4a e ausente P1a, portanto, parece que P1a pode ser mais antigênico que P4a (figura 8-b).

Os peptídeos P2a e P3a apresentaram baixa antigenicidade, porém, os resultados sugerem que P3a possa ter maior potencial antigênico em relação a P2a, baseando-se em uma pequena diferença de absorbância utilizando MAPs com P3a em comparação aos MAPs com P2a (figura 8-b). A análise química de P3a sugere uma estrutura estável, demonstrando $II < 40$, enquanto que P2a, uma estrutura não estável (tabela 2). Aparentemente, as seqüências de aminoácidos presentes em P3a, disponíveis “in vivo” podem ter sido expostas de maneira preferencial à produção de anticorpos, quando comparada à P2a.

Os valores de absorbância obtidos em ELISA com MAPs contendo dois ou três peptídeos e soro hiperimune anti-LV-Tcra, apresentaram resultados semelhantes

(figura 8-b), porém, a diferença de reatividade apresentada entre o C+1:50 e C- 1:50 com MAPs contendo dois peptídeos, variou entre 0,9-6,8 vezes, enquanto que MAPs com três peptídeos, esta diferença foi entre 1,09-8,35. Mesmo sendo P1a e P4a os peptídeos considerados com maior potencial antigênico, a adição de outras frações pode melhorar o desempenho do teste ELISA para pesquisa de anticorpos, visto, que as amostras de soro utilizadas possuem diversidade de anticorpos produzidos contra diferentes determinantes antigênicos presentes no extrato bruto de *T. crassiceps*, LV-Tcra.

Maior reatividade aos extratos parasitários foi notada em relação aos peptídeos sintéticos, já que antígenos nativos possuem em grandes números, diversos determinantes antigênicos (GEVORKIAN et al., 1996), tornando mais reativo o ensaio imunológico.

5.2.2- Utilizando anticorpos monoclonais

A reatividade dos AcMos anti-*T. crassiceps* e anti-*T.solium* com 18/14, demonstrada anteriormente por nossa equipe, e a confirmação da presença destas proteínas nos antígenos LV-Tcra e ES-Tcra, tornam o estudo da antigenicidade dos peptídeos sintéticos com AcMos, uma etapa importante, visando a seleção de peptídeos mais reativos e comparáveis ao antígeno nativo 18/14, que foi considerado como referência de antigenicidade e especificidade para o diagnóstico da NC (ESPINDOLA et al., 2002,2005).

A reatividade dos peptídeos P1a e P1b com AcMos anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso e anti-T-Tso (tabela 8), confirmam a presença de seqüências de aminoácidos em comum, entre os antígenos de LV-Tcra, ES-Tcra e proteínas de

baixo peso de *T.solium*, visto que os AcMos utilizados reconheceram apenas as proteínas de 14-12 kDa em Imunoblot com T-Tso (tabela 4).

A reatividade de P2a e P3a com apenas o AcMo anti-ES-Tcra e o AcMo anti-T-Tso, que também reconheceram P1a e P1b, sugere que a interação antígeno-anticorpo pode ter sido baseada em uma conformação estrutural similar à presente em 18/14, mesmo que as seqüências de aminoácidos entre os antígenos possam ser diferenciadas. Provavelmente, o reconhecimento foi baseado numa porção menor ou menos antigênica de 18/14, dificultando o reconhecimento por AcMos ou representando uma conformação estrutural não restrita em solução (GONZÁLES-SAPIENZA; CACHAU, 2003).

Outra hipótese para a reatividade de P2a e P3a com os dois AcMos seria a possível semelhança com a proteína de 30 kDa presente em Imunoblot com ES-Tcra, porém, não detectada nos antígenos de LV-Tcra. Segundo Espindola et al. (2002), a proteína de 30 kDa possui importância clínica, visto que todas as amostras de soros de pacientes com NC que possuíam anticorpos anti-cisticercos de *T. solium* apresentaram reatividade.

P4a e P4b, seriam os peptídeos com maior perspectiva de utilização em ensaios para o diagnóstico da cisticercose, visto a importância das proteínas de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps*, porém, não houve reatividade com os AcMos utilizados neste estudo. A presença de poucos aminoácidos, a possibilidade de diferente estrutura tridimensional em comparação com a proteína nativa e a presença de moderada estabilidade das estruturas secundárias (SCHELLEKENS et al., 2005), podem ter dificultado a ligação do epítipo com o AcMo.

5.2.3- Utilizando amostras de soros humanos

Ao analisar a antigenicidade dos peptídeos sintéticos utilizando amostras de soros humanos, nota-se uma predileção para a utilização de P1a ou P1b (figura 9-a), devido à distinção dos anticorpos presentes nos soros de pacientes com NC e de indivíduos supostamente saudáveis. Autores sugerem a utilização de MAP para a inclusão no sorodiagnóstico da cisticercose, na tentativa de obter melhores resultados (FERRER et al., 2005; GEVORKIAN et al., 1996; GONZÁLES-SAPIENZA; LORENZO; NIETO, 2000; HERNANDEZ et al., 2000).

A baixa positividade dos ensaios realizados com peptídeos sintéticos isolados ou MAP, em relação ao antígeno bruto no imunodiagnóstico da NC foi documentada por Gevorkian et al. (1996) e Bueno et al. (2005), podendo ocorrer por alguns fatores, como: a porção sintetizada constituir uma faixa estreita de aminoácidos em relação ao antígeno nativo; alterações nas pontes dissulfeto (HANCOCK et al., 2004) ou até mesmo, alterações de pH do meio e ligações secundárias entre os radicais dos aminoácidos (MACHADO et al., 2004).

Analisando os MAPs com três peptídeos, contendo P1a ou P1b, pôde-se notar alguma distinção dos soros de pacientes com NC e de indivíduos supostamente saudáveis, porém MAPs contendo apenas dois peptídeos não foram suficientes para a discriminação dos soros humanos, havendo, portanto, a necessidade de adição de diferentes epítomos, como a utilização de MAPs com três ou mais peptídeos.

5.3- TESTE ELISA UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS PARA O SORODIAGNÓSTICO DA CISTICERCOSE

Para a análise do teste ELISA para o sorodiagnóstico da NC, peptídeo isolado ou MAPs foram utilizados como antígenos e ensaiados com amostras de soros humanos, a fim de comparar a positividade e a reatividade cruzada. Para a seleção do peptídeo isolado a ser utilizado, os índices de hidrofobicidade (tabela 3) e os resultados de antigenicidade foram levados em consideração (tabela 9).

Os estudos de antigenicidade, utilizando peptídeos isolados, selecionaram P1a e P1b como potencialmente antigênicos, já que ambos apresentaram reatividade com AcMos anti-*T. solium* e anti-*T. crassiceps* e amostras de soros humanos de pacientes com NC, porém, maior positividade foi direcionada para P1b. Sendo assim, P1b foi escolhido para ser utilizado em teste ELISA com maior número de amostras de soros humanos.

Para compor MAP-a, P1a foi selecionado para o complexo antigênico, devido apresentar baixo índice hidrofóbico (tabela 3) e maior reatividade quando utilizado em MAPs (figura 9-b), em comparação a P1b. Desta forma, P1a poderia representar epítomos presentes na proteína nativa, além de descartar a hipótese de que a adição de diferentes aminoácidos presentes somente em P1b, poderia criar um componente desfavorável para a ligação dos anticorpos hiperimunes, devido às interações intracadeia (GONZÁLES-SAPIENZA; CACHAU, 2003). Diversas composições de MAPs foram ensaiadas (dados não mostrados), porém, não apresentaram maior antigenicidade. A adição de P3a e P4a foi baseada na reatividade com MAPs contendo os dois peptídeos e amostras de soros humanos.

A positividade de P1b foi similar à obtida por Greene et al. (2000) e Hernandez et al. (2000) e superior ao descrito por Fleury et al. (2003). P1b possui em sua sequência, 11 aminoácidos de caráter hidrofóbico (análise dos algoritmos) e, portanto, podem pertencer a um domínio transmembrana. Chung et al. (1999) comentaram sobre a possibilidade da sequência de aminoácidos de transmembrana estarem “in vivo” nos locais de interação hidrofóbica, com outras moléculas que possuam atividade biológica, podendo assim, apresentar especificidade antigênica.

MAP-a utilizado neste trabalho conteve a junção de 53 aminoácidos. Os resultados apresentados por esta combinação de peptídeos foram similares aos demonstrados por Bueno et al. (2005), que utilizaram peptídeo isolado com 66 aminoácidos. Hancock et al. (2003) utilizaram vários peptídeos baseados em *T. solium*, porém, apenas um deles apresentou a positividade equivalente ao antígeno bruto de 8 kDa, presumindo, que as porções peptídicas previamente selecionadas, podem demonstrar caráter diferente em imunodiagnóstico, mesmo sendo potencialmente antigênicas.

Os dados aqui obtidos apresentaram positividade superior aos demonstrados por Gevorkian et al. (1996) e Hernandez et al. (2000), provavelmente, devido a seqüências de aminoácidos de *T. crassiceps* utilizadas naqueles estudos possuírem homologia com proteínas de alto peso molecular. Longas seqüências de aminoácidos podem possibilitar uma maior reatividade com os anticorpos presentes no soro hiperimune, devido à diversidade dos anticorpos presentes no soro, justificando neste estudo, a maior positividade dos MAP em comparação aos peptídeos isolados.

Analisando o desempenho do ELISA com peptídeos sintéticos, MAP-a apresentou maior positividade, em relação ao uso de P1b, principalmente quando a

análise utilizou o *cut off* TG-ROC (tabela 10). A média de absorbância dos ensaios com MAP-a e P1b, utilizando amostras de soros NC, foram, respectivamente, 0,73 e 0,42. Greene et al. (2000) e Fleury et al. (2003) quando utilizaram MAP contendo peptídeos sintéticos baseados em proteínas de *T. solium* e *T. saginata*, não obtiveram maior reatividade em relação a peptídeos isolados, sendo que o oposto foi obtido por Ferrer et al., 2005.

Utilizando como parâmetro os diferentes *cut off* do teste ELISA com MAP-a, uma (*cut off* a), três (*cut off* b) e cinco (TG-ROC) amostras de soros de pacientes com NC que apresentaram reatividade, não apresentaram positividade em ELISA com P1b, sugerindo que a adição de P3a e P4a foram importantes para a distinção das amostras dos soros humanos.

Duas amostras de soros de pacientes com NC não apresentaram reatividade com P1b e MAP-a. Vale ressaltar, que as duas amostras eram reativas em ELISA com 18/14 para pesquisa de anticorpos.

Existem algumas possibilidades para a ocorrência dos resultados falsos negativos para pesquisa de anticorpos anti-cisticercos, como: a presença de diferentes fases evolutivas da cisticercose (BUENO et al., 2000; CHUNG et al., 1999), ausência de excreção e secreção de proteínas imunogênicas pelos cisticercos para estimular o sistema imune do hospedeiro (ESPINDOLA et al., 2002), presença de poucos cisticercos (BUENO et al., 2005; SAKO et al., 2000), tratamento do paciente (ESPINDOLA et al., 2005; TSANG; BRAND; BOYER, 1989; WILSON et al., 1991;) e tolerância imunológica ou diminuição da imunidade (CHUNG et al., 1999).

Analisando o mesmo número de amostras de soros de pacientes com NC e indivíduos supostamente saudáveis (tabela 11), os resultados de positividade,

utilizando o *cut off* TG-ROC, foram praticamente semelhantes aos apresentados com o total de amostras ensaiadas, embora, com MAP-a maior positividade foi demonstrada neste experimento. Assim, MAP-a apresentou maior positividade com amostras de soros de pacientes com NC e menor com amostras de soros de indivíduos supostamente saudáveis, em relação a P1b.

A positividade de P1b e MAP-a com amostras de soros de indivíduos supostamente saudáveis, variou de 1,3-11,8% e 1,4-9,6%, respectivamente. A média de absorbância do ELISA com P1b foi de 0,11 e com MAP-a 0,15. Os resultados obtidos foram similares a outros estudos utilizando peptídeos sintéticos (BUENO et al., 2005; FERRER et al., 2005).

P1b e MAP-a apresentaram índices de positividade similares com amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Rio Grande do Sul, 3,4-10,2% e 0,0-13,3%, sendo que maiores valores foram obtidos utilizando amostras de soros de pacientes com hidatidose provindos do Peru, 0,0-50,0% e 12,5-37,5%. Isto é possível, devido à diversidade gênica do parasita em determinadas comunidades geográficas (FERRER et al., 2005) ou pela prevalência de NC no Peru (DIAZ et al., 1992), o que não descarta a possibilidade destes pacientes também terem NC.

Das 15 amostras de soros H-R que foram utilizadas com P1b e MAP-a, duas (H-2 e H-12) apresentaram reatividade com P1b e uma (H-2) com MAP-a e das 8 H-P, três apresentaram reatividade com P1b (P-21, P-23 e P-24) e três com MAP-a (P-21, P-22 e P-23), permitindo supor que a reatividade dos soros pode não ter sido baseada nas mesmas porções antigênicas.

A reatividade cruzada com hidatidose pode ser relevante para o sorodiagnóstico em nosso meio, mas, diferentes características clínicas podem ser observadas entre as infecções parasitárias (ISHIDA et al., 2003).

O grupo OP apresentou positividade de 0,0-9,1% (tabela 10), porém, estes resultados já seriam esperados, pois, refletem a positividade da população geral, especialmente em nosso país, em que doenças parasitárias são prevalentes, além, de testes ELISA poderem apresentar positividade inespecífica, pelas próprias características da técnica (BRAGAZZA et al., 2002). Uma amostra de soro de paciente com toxocaríase apresentou reatividade com P1b, porém, esta reatividade necessita ser estudada, pois, a reatividade de LV-Tcra com amostras de soros de pacientes com toxocaríase, já foi documentada por nossa equipe (BRAGAZZA et al., 2002).

As amostras de soros ISS, H-R, H-P e OP que apresentaram positividade em ELISA com os peptídeos sintéticos (valores de absorbância acima do *cut off* b) foram ensaiadas por Imunoblot com 18/14, porém, não reagiram com as frações proteicas citadas. Assim, pode-se afirmar que a reatividade ocorreu pela inespecificidade do teste ou pela homologia dos peptídeos a frações proteicas de alto peso molecular.

5.4- EFEITO DA ADIÇÃO DO ANTÍGENO 18/14 AOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Inicialmente, a adição de antígeno nativo a MAPs pareceu não favorecer a reatividade da mistura antigênica às amostras de soros de pacientes com NC que apresentaram reatividade em ELISA com 18/14 (figura 11), além, de ter diminuído a positividade do teste, quando comparado aos valores de absorbância do ELISA com apenas 18/14. Este fato pode ser explicado pela obtenção de antígenos por vias diferentes, sendo que o antígeno de 18/14 não passa por situações desnaturantes (MONTERO et al, 2003), enquanto que para a síntese dos peptídeos, o uso de pH extremo, como a adição de ácidos, pode ter gerado cargas que desfavorecem a

interação com os antígenos nativos. Assim, a purificação dos peptídeos e antígenos recombinantes, embora de difícil controle, preferencialmente deve ser feita de forma a manter as características do antígeno nativo (MONTERO et al., 2003), para que estas interferências possam ser contornadas.

Antígenos nativos utilizados para o diagnóstico da cisticercose, possuem em suas seqüências, glicoproteínas, visto que estudos realizados por outros autores, demonstraram que possuem combinações de carboidratos e epítomos proteicos (MONTERO et al., 2003; SAKO et al., 2000).

MAP com 18/14 foi também utilizado com amostras de soros de pacientes com NC que não apresentaram reatividade em ELISA com 18/14. Utilizando a curva TG-ROC como referência, pôde-se observar que duas amostras de soros foram consideradas reativas neste ensaio, supondo, que a interação dos peptídeos com antígeno nativo pôde criar uma estrutura diferenciada reconhecida pelos anticorpos presentes nestas amostras, porém, ao mesmo tempo em que as duas amostras de pacientes com NC (NC2) foram consideradas positivas, outras três (NC1) foram consideradas negativas (figura 11), portanto, não viável ao diagnóstico.

Estes dados ressaltam a importância da resposta imune, destacando a variação do hospedeiro (nutrição, variáveis genéticas e saúde) e variabilidade antigênica do parasita (MANOUTCHARIAN et al., 1996).

5.5- DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA NEUROCISTICERCOSE UTILIZANDO PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos não foram representativos dos epítomos imunodominantes presentes nas proteínas de cisticercos, porém, P1a e P1b podem ser considerados com potencial antigênico e serem explorados em outros complexos antigênicos.

A metodologia para a síntese dos peptídeos ainda é considerada de elevado custo, o que limita a investigação de outras seqüências que permitam a obtenção de um conjunto de peptídeos equivalentes quanto à eficiência dos antígenos nativos.

O *cut off* analisado pela curva TG-ROC possui maior sensibilidade em comparação aos demais, porém, menor especificidade (Tabela 10). Caso o teste ELISA com MAP-a fosse utilizado para o sorodiagnóstico da NC, poderia ser estimado em torno de 8% de falsos-negativos, sendo que a maioria das amostras de soros NC que apresentaram valores de absorbância abaixo do *cut off* eram provenientes de pacientes em tratamento, e 10% de falsos-positivos.

Valores de absorbância acima do *cut off* a (Figura 10-a) foram considerados como de alta especificidade, dispensando nestes casos, a confirmação pelo Imunoblot com 18/14, porém, menos sensível, confirmando o desempenho ainda pobre dos peptídeos sintetizados. A adição de novas seqüências antigênicas deve ser ensaiada para o desenvolvimento de um teste com maior sensibilidade.

Ora, o teste ELISA com 18/14 possui ainda melhor sensibilidade e especificidade, quando comparado aos testes com peptídeos sintéticos, dispensando, até mesmo, a confirmação por Imunoblot (ESPINDOLA et al, 2005). Assim, no momento, não se pretende com os peptídeos sintéticos, o desenvolvimento de um teste para triagem,

mas sim, o uso de MAP para a confirmação de casos, como por exemplo, em estudos de reatividade cruzada.

Assim, o presente trabalho apresenta peptídeos promissores para o uso no diagnóstico laboratorial, porém, novas seqüências devem ser incorporadas para o aumento da sensibilidade e especificidade.

Pretende-se em uma próxima etapa, a combinação de peptídeos sintéticos e antígenos recombinantes para o estudo do sorodiagnóstico da NC, além, da utilização dos peptídeos na tentativa de correlacionar a fase da cisticercose presente no paciente. Este ensaio, inicialmente poderia ser realizado com o acompanhamento da cisticercose experimental, cisticercose suína ou bovina.

Em breve, estudos para a obtenção de vacinas para murinos e suínos contra a cisticercose serão desenvolvidos pela equipe, partindo-se inicialmente, com antígenos brutos e purificados de *T. solium* e *T. crassiceps*, porém, em um segundo momento, a integração de peptídeos sintéticos seria de grande valia, visto a segurança do complexo antigênico para o acompanhamento da resposta imune.

6- CONCLUSÃO

- A partir da análise do potencial hidrofílico/antigênico e da homologia das proteínas traduzidas de *T. solium* e *T. crassiceps*, sete peptídeos foram sintetizados, sendo inicialmente todos considerados potencialmente antigênicos.
- O estudo da antigenicidade dos peptídeos apresentou P1a e P1b como os mais antigênicos. Ambos foram reativos com AcMos anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* e amostras de soros humanos de pacientes com NC.
- A aplicação de MAP-a apresentou maior positividade com amostras de soros NC em relação a P1b no sorodiagnóstico da cisticercose, porém, os peptídeos utilizados ainda não foram representativos dos epítomos imunodominantes presentes em cisticercos de *T. solium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT (ACD/LABS). Chemskech: protein analyses. Disponível em: <http://www.acdlabs.com>. Acesso 30 maio 2005.

AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arq. Neuropsiquiatr**, São Paulo, v.61, n. 3-B, p. 822-828, abr., 2003.

BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMURA, P.M.; ESPINDOLA, N.M; PARDINI, A.; BUENO, E.C. Frequency of serum anti-cysticerci antibodies in the population of a rural brazilian community (cassia dos coqueiros, SP) determined by ELISA and Immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Rev. Inst. Med.trop.S.Paulo**, São Paulo, v.44, n.1, p.7-12, feb., 2002.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução n. 196 de 10 de out. 1996. Diário Oficial da União, Brasília, 16 out. 1996, seção 1, n.201, p. 21082-21085. [O plenário do Conselho Nacional de Saúde aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos]. Brasília: 1996.

BUENO, E. C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A., MIELLE, S.R. Specific *Taenia crasiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v.38, n.1, p.146-151, jan., 2000.

BUENO, E.C. **Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T.solium* e *T.crassiceps***. 1999. 144p. Dissertação (mestrado em Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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.**, United States, v. 72, n.2, p.278-283, mar., 2005.

CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **Lancet Infect. Dis.**, United States, v.2,n.12, p.751-762, dec., 2002.

CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, A.W. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, Hagerstown, v.39, n.10, p.1025-1040, oct., 1998.

CHAMEKH, M; GRAS-MASSE H; BOSSUS M; FACON B; DISSOUS C; TARTAR A; CAPRON A. Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. **J.Clin.Invest.**, United States, v. 89, n.2, p.458-464, feb. 1992.

CHONG, L.T.; DEMPSTER, S.E.; HENDSCH, Z.S.; LEE, L.P.; TIDOR, B. Computation of electrostatic complements to proteins: a case of charge stabilized binding. **Protein Sci.**, United State, v.7, n. 1, p.206-210, jan., 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. **The Journal of Infectious Diseases**, United States, v. 180, n.4, p.1307-1315, oct., 1999.

CORREA, W.M.; PARDINI, A.X.; BAREA, T.S.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Caracterização de antígeno glicoproteico de *T. crassiceps* para pesquisa de anticorpos na neurocisticercose humana. **Rev. Bras. Ciências Farmac.**, São Paulo, v.36, supl. 1., 2000.

DEL BRUTTO, O.H; RAJSHEKHAR, V.; WHITE JUNIOR, 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.; GONZALES, A.E.; GILMAN, R.H.; GARCIA, H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, United States, v.57, p. 177-183, jul., 2001.

DIAZ, F.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; GONZALES, A.E.; CASTRO, M.; TSANG, V.C.W.; PILCHER, J.B.; VASQUEZ, L.E.; LESCANO, M.; CARCAMO, C.; MADICO, G.; MIRANDA, E. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. **American Journal of Epidemiology**, United States, v. 135, n. 8, p. 875-882, apr., 1992.

EARNEST, M.P; RELLER, L.B.; FILLEY, C.M.; GREK, A.J. Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.9, n.5, p. 961-979, sep., 1987.

EISENBERG, D.; SCHWARZ, E.; KOMAROMY, M.; WALL, R. Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. **J. Mol. Biol.**, England, v.179, n.1, p.125-142, oct., 1984.

ESPINDOLA, N.M. **Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana**. 2004. 95f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ESPINDOLA, N.M.; DE GASPARI, E.N.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. **Veterinary Parasitology**. Netherlands, v. 89, n.4, p.321-326, may., 2000.

ESPINDOLA, N.M.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.; FERNANDEZ, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticercis, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, England, v.96, n.4, p. 361-368, apr., 2002.

ESPINDOLA, N.M.; IHA, A.H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O.M.; MACHADO, L.R.M.; LIVRAMENTO, J.A.; MAIA, A.A.M.; PERALTA, J.M.; VAZ, A.J. Cysticercosis Immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticerci antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v. 43, n.7, p. 3178-3184, jul., 2005.

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. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.84, n.4, p.559-562, jul-aug., 1990.

FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v.111, n.1, p.83-84, jan., 2003.

FERRER, E.; MOYANO, E.; BENITEZ, L. Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. **Parasitol. Res.**, Germany, v.91, n.1, p.60-67, sep., 2003.

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. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene**, England, v.99, n.8, p.568-576, aug., 2005.

FISCHER, C.; NOSRATON, R.; HABTEMICHAEL, N.; TALLE, 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.**, Germany, v.45, n.4, p.324-328, dec., 1994.

FLEURY, A.; BELTRAN, C.; FERRER, E.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; MICHAEL, E.; PARKHOUSE, E.; GARCIA, E.; FRAGOSO, G.; COSTA-CRUZ, J.; BIONDI, G.; AGAPEJEV, S.; SCIUTTO, E. Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health.**, England, v.8, n. 12, p. 1124-1130, dec., 2003.

FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Trop.**, Amsterdam, v.87, n.1, p.43-51, jun., 2003.

FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. **Can. J. Zoo.**, Ottawa, v.40, p.969-990, 1962.

GARCIA, H.H.; GONZALES, A.E.; GILMAN, R.H.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Diagnosis, treatment and control of *T. solium* cysticercosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, United States, v.16, n.5, p.411-419, oct., 2003.

GARCIA, H.H.; EVANS, C.A.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; WHITE, A.C.; WHITE JUNIOR, 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. **Clinical Microbiology Reviews.**, United States, v.15, n.4, p.747-756, oct., 2002.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infect Dis Clin North Am.**, United States, v.14, n.1, p.97-119, mar., 2000.

GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.; GILMAN, R.H. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.92, n.4, p.411- 414, jul-aug., 1998.

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. **Immunology Letters**, Netherlands, v.49, n.3, p.185-189, mar. 1996.

GONZALEZ, A.E.; CAMA, V.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.; PILCHER, J.B.; CHAVERA, A.; CASTRO, M.; MONTENEGRO, T.; VERASTEGUI, M.; MIRANDA, E.; et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Northbrook, v.43, n.2, p.194-199, aug., 1990.

GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W. Control of *Taenia solium*. **Acta. Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p. 103-109, jun., 2003.

GONZALEZ-SAPIENZA, G.; CACHAU, R.E. Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B. **J. Biol. Chem.**, United States, v. 278, n.22, p. 20179-20184, mar., 2003.

GONZALEZ-SAPIENZA, G.; LORENZO, C.; NIETO, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v.38, n.11, p.3979-3983, nov., 2000.

GREENE, R.M.; WILKINS, P.; TSANG, V.C.W. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. **Molecular and Biochemical Parasitology**, New York, v.99, n.2, p.257-261, apr., 1999.

GREENE, R. M.; HANCOCK, K.H.; WILKINS, P.P.; TSANG, V.C.W. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. **J. Parasitol**, United States, v. 86, n. 5, p. 1001-1007, oct., 2000.

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, Netherlands, v. 185, n.1, p. 123-132, sep., 1995.

HANCOCK, K; KHAN, A.; WILLIAMS, F.B.; YUSHAK, M.L.; PATTABHI, S.; NOH, J.; TSANG, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, v.41, n.6, p.2577-2586, jun., 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 GP 50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Netherlands, v.113, n. 1, p.115-124, jan., 2004.

HERNANDEZ, M; BELTRÁN, C.; GARCIA, E.; FRAGOSO, G.; GEVORKIAN, G.; FLEURY, A.; PARKHOUSE, M.; HARRISON, L.; SOTELO, J.; SCIUTTO, E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. **Immunology Letters**, Netherlands, v.71, n.1, p. 13-17, jan., 2000.

HERNANDEZ H., NIEHAUSER S., BOLTZ S.A., GAWANDI V., PHILLIPS R.S., AMSTER I.J. Mass defect labeling of cysteine for improving peptide assignment in shotgun proteomic analyses. **Anal Chem.**, United States, v. 78, n.10, p.3417-3423, may., 2006.

HOROVITZ, A.; SERRANO, L.; AVRON, B.; BYCROFT, M.; FERSHT, A.R. Strenght and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability. **J.Mol.Biol.**, England, v.216, n.4, p.1031-1044, dec.,1990.

HUISA, B.N.; MENACHO, L.A.; RODRIGUEZ, S.; BUSTOS, J.A.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. Taeniasis and cysticercosis in housemaids working in affluent neighborhoods in Lima, Peru. **Am J Trop Med Hyg.**, United States, v.73, n.3, p.496-500, sep., 2005.

ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOCINO-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 Tropica**, Amsterdam, v.89, n.1, p.73-84, dec., 2003.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.H.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **Am J Trop Med Hyg.**, United States, v.59, n.2, p.291-294, aug., 1998.

JIMENEZ, L.; LANDA, A, BECERRA, A. Cloning, expression and partial characterization of a gene encoding the S15a ribosomal protein of *Taenia solium*. **Parasitol. Res.**, Germany, v.92, n.5, p.414-420, mar., 2004.

KOHN, W.D.; KAY, C.M.; HODGES, R.S. Orientation, positional, additivity, and oligomerization-state effects of interhelical ion pairs in α -helical coiled-coils. **J.Mol. Biol.**, England, v. 283, n.5, p.993-1012, nov., 1998.

KYTE, J; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, England, v.157, n.1, p.105-132, may., 1982.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n. 5259, p. 680-685, aug., 1970.

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*) and hydatid disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.40, n. 3, p.282-290, mar., 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.**, Chicago, v.114, n.9, p.926-928, sep., 1990.

LIVRAMENTO, J.A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, Brazil, v.39, n.3, p. 261-278, 1981.

LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R.; SPINA-FRANÇA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: FEJERMAN, N.; CHAMOLES, N.A; eds. **New trends in pediatric neurology**. New York: Elsevier Science Publishers, 1993. p.307-312.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

MACHADO, A.; LIRIA, C.W.; PROTI, P.B.; REMUZGO, C.; MIRANDA, T.M. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Quim. Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.781-789. jun., 2004.

MACHADO, A.B.B.; PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral de São Paulo, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n.3, p.240-244, 1988.

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. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. Netherlands, v. 99, n. 1-2, p.11-24. may., 2004.

MANOUTCHARIAN, K.; ROSAS, G.; HERNÁNDEZ, M.; FRAGOSO, G.; ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; RODARTE, L.F.; SCIUTTO, E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. **J. Parasitol.**, United States, v.82, n.2, p.250-254, apr.,1996.

MANOUTCHARIAN, K.; SOTELO, J.; GARCIA, E.; CANO, A.; GEVORKIAN, G. Characterization of cerebrospinal fluid antibody specificities in neurocysticercosis using phage display peptide library. **Clinical immunology**, United States, v.91, n.1, p.117-121, apr.1999.

MARQUARDT, M; EIFHER-LIMA. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Quim. Nova**, São Paulo, v.24, n.6, p.846-855, 2001.

MEZA, N.M.; 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.**, United States, v.73, n. 3, p.504-509, sep., 2005.

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.**, United States,v.66, n.6, p.777-781, jun. 2002.

MONTERO, E.; GONZÁLES, L.M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. *Taenia solium* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for human cysticercosis. **Journal of Chromatography B.**, Netherlands, v. 786, n.1-2, p. 255-269, mar., 2003.

MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cysticercosis. **Mem. Inst. Osw. Cruz**. Rio de Janeiro, v.3, p. 320-327, 1911.

NASH, T.E. Human case management and treatment of cysticercosis. **Acta Trop.** Amsterdam, v.87, n.1, p.61-69, jun., 2003.

NATIONAL LIVRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. GenBank: Sequence. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>. Acesso Gi 24940275

NATIONAL LIVRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. GenBank: Sequence. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/wblast2.cgi>. Acesso Gi 463900.

NICOLETTI, A.; BARTOLONI, A.; SOFIA, V.; BARTALESI, F.; CHAVEZ, J.R.; OSINAGA, R.; PARADISI, F.; DUMAS, J.L.; TSANG, V.C.; REGGIO, A.; HALL, A.J. Epilepsy and neurocysticercosis in rural Bolivia: a population-based survey. **Epilepsia**, United States, v.46, n.7, p.1127-1132, jul., 2005.

NIETO, C. Cysticercosis of the central nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. **Neurology**, Minneapolis, v.6, n.10, p.725-738, oct., 1956.

NOYA, O; PATARROYO ME, GUZMAN F, ALARCON DE NOYA B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Curr Protein Pept Sci.**, Netherlands, v.4, n.4, p.299-308, aug., 2003.

PARDINI, A.X.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A. Cysticerci antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, United States, p.3368-3372, set., 2001.

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* cysticerci for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.38, n.2, p 159-168. mar., 2002.

PESSOA, S.B., MARTINS, A.V., IN: PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p.498-519.

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.**, Oxford, v.24, n.5, p.733-738, aug., 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.**, Germany, v.85, n.8-9, p.680-684, aug., 1999.

POETSCH M, WITTIG H, KRAUSE D, LIGNITZ E. The impact of mtDNA analysis between positions nt8306 and nt9021 for forensic casework. **Mitochondrion**. Netherlands, v. 3, n.3, p.133-137, nov., 2003.

PROT PARAM TOOL. Protparam: protein analyses. Disponível em: <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Acesso em 20 janeiro 2005.

PROTSKALE. Disponível em: <http://www.expasy.org/cgi/bin/protscale.pl>. Acesso em 20 de janeiro 2005.

RAMOS JUNIOR, A.N.; MACEDO, H.W.; RODRIGUES, M.C.; PERALTA, R.H.; MACEDO, N.A.; MARQUES, M.C.; PAES, A.N.; CASTRO, J.A.; ARAUJO, A.J.; PERALTA, J.M. Seroepidemiological survey of human cysticercosis in a municipality of Piauí State, Northeast Brazil. **Cad. Saude Publica.**, São Paulo, v.20, n.6, p.1545-1555, nov., 2004.

RAHALKAR, M.D. The many faces of cysticercosis. **Clin Radiol.**, England, v.55, n.9, p. 668-674, sep., 2000.

RESTREPO, B. I., OBREGÓN-HENAO, A., MESA, M., GIL, D. L., ORTIZ, B. L., MEJÍA, J. S., VILLOTA, G. E., SANZÓN, F. TEALE, J. M. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. **Inter. J. Parasitol.**, Lawrence, v.30, n.6, p.689-696, may., 2000.

RODRIGUEZ-CANUL, R., ALLAN, J. C., FLETES, C., SUTISNA, I. P., KAPTI, I. N., CRIAG, S. P. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, United States, v.4, n.5, p.579-582, sep., 1997.

ROVERO, P.; QUARTARA, L.; FABBRI, G. Solid-phase synthesis of neurokinin A antagonists. Comparison of the BOC and Fmoc methods. **Int. J. Pept. Protein. Res.**, Denmark, v.37, n.2, p.140-144, feb., 1991.

SAKO, Y.; NAKAO, M.; IKEJIMA, T.; PIAO, X.Z.; NAKAYA, N.; ITO, A. Molecular Characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. **Journal Clinical Microbiology**, United States, v.38, n.12, p. 4439-4444, dec., 2000.

SATO, M.O.; YAMASAKI, H.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; PLANCARTE, A.; KASSUKU, A.A.; DORNY, P.; DORNY, P.; GEERTS, S.; BENITEZ-ORTIZ, W.; HASHIGUCHI, Y.; ITO, A. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in wine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Veterinary Parasitology**. Netherlands, v.111, n.4, p.309-322, feb., 2003.

SCHANTZ, P.M.; MOORE, A.C.; MUNOZ, J.L.; HARTMAN, B.J.; SCHAEFER, J.A.; ARON, A.M.; PERSAUD, D.; SARTI, E.; WILSON, M.; FLISSER, A. Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.327, n.10, p.692-695, sep., 1992.

SCHANTZ, P.M.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAWLOWSKI, Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bull. Pan. Am. Health Organ.**, Washington, v. 27, n. 4, p.397-402.1993.

SCHANTZ, P.M.; et al. *Taenia solium* cysticercosis as an imported disease. In: GARCIA, H.H.; MARTINEZ, M. (Eds). *Taenia solium* Taeniasis/cysticercosis. **Universo**, Peru, p. 263-272.1999.

SCHELLEKENS M.; HOPPELER R.; PERRIN A.; GOMES J.V.; BOIRON D.; ASPECT A.; WESTBROOK C.I. Hanbury Brown Twiss effect for ultracold quantum gases. **Science**, United States, v.310, n. 5748, p. 648-651, oct., 2005.

SILVA, A.V.M. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p.227-238.

SILVA-VERGARA, M.L.; PRATA, A.; VIEIRA, C. DE O.; CASTRO, J.H.; MICHELETTI, L.G.; OTANO, A.S.; FRANQUINI JUNIOR, J. The epidemiological aspects of taeniasis-cysticercosis in an endemic area of Lagamar, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Trop. S.Paulo**, São Paulo, v.28, n.4, p.345-349. oct-dec., 1995.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid. Immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 51, n.1, p. 16-20, mar., 1993.

TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Neurocysticercosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo, v.34, n.3, p.283-290, may., 2001.

TAKAYANAGUI, O.M.; CASTRO E SILVA, A.A.; SANTIAGO, R.C.; ODASHIMA, N.S.; TERRA, V.C.; TAKAYANAGUI, A.M. Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirao Preto-SP, Brazil **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v.54, n.4, p.557-564, dec., 1996.

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.**, Chicago, v.159, n.1, p.50-59, jan., 1989.

VAZ, A.J. **Cysticercus longicollis: caracterização antigênica e desenvolvimento de testes imunológicos para pesquisa de anticorpos em líquido cefalorraquiano na neurocisticercose humana.** 1993. Tese (Doutorado de Análises Clínicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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. p. 316-322.

VAZ, A. J.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; FERREIRA, A.W. Dot-ELISA for detection of anti-*Cysticerci cellulosa* antibodies in human cerebrospinal fluid samples using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics) and *Cysticerci longicollis* antigens. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, nov-dec., 1996.

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; DA SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERRERIRA, W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, United States, v.57, n.3, p.354-357, sep., 1997.

WANDRA, T.; DEPARY, A.A.; SUTISNA, P.; MARGONO, S.S.; SUROSO, T.; OKAMOTO, M.; CRAIG, P.S.; ITO, A. Taeniasis and cysticercosis and Bali and North Sumatra, Indonesia. **Parasitol.Int.**, Netherlands, v.55, suppl.S, p.155-160, dec., 2006.

WILSON M.; BRYAN R.T.; FRIED J.A.; WARE D.A.; SCHANTZ P.M.; PILCHER J.B.; TSANG V.C. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **J Infect Dis.**, United States, v. 164, n.5, p.1007-1009, nov., 1991.

WOOLLARD, D.J.; GAUCI, C.G.; LIGTOWLERS, M.W. Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*. **Vaccine**, Netherlands, v.18, n.9-10, p.785-794, dec., 1999.

YANG, H.J.; CHUNG, J.Y.; YUN D.H; ITO, A.; MA, L.; LIU, Y.H.; LEE, S.C.; KANG, S.Y.; KONG, Y.; CHO, S.Y. Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. **Parasite Immunol.**, England, v. 20, n.10, p. 483-488, oct., 1998.

ZARLENGA JUNIOR, D. S.; RHOADS, M.L.; AL-YAMAN, F.M. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 67, n.2, p. 215-223, oct., 1994.

ANEXO I- Aval do comitê de ética em pesquisa animal. *OICEA nº 12***UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas****Comissão de Ética em Experimentação Animal****CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto “Cisticercose: Imunodiagnóstico, antígenos, resposta imunológica e aspectos clínico-epidemiológicos” (Protocolo nº13), sob a responsabilidade da Sra. Adelaide José Vaz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 02/06/2003.

São Paulo, 03 de junho de 2003.

*Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA*

ANEXO II- Aval do comitê de ética em pesquisa humana **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
*Comitê de Ética em Pesquisa - CEP*Ofício CEP nº 52

São Paulo, 27 de maio de 2003.

Ilmo(a). Sr(a)
Adelaide José Vaz

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 26 de maio passado, **APROVOU** o projeto intitulado "Cisticercose: Imunodiagnóstico, Antígenos, Resposta Imunológica e Aspectos Clínico-Epidemiológicos", apresentado por V.Sa.

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. Dr. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

ANEXO III- Informações para os membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP