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

Avaliação da imunidade protetora induzida com antígeno bruto e purificado de *Taenia crassiceps* contra cisticercose murina

CRISTIANE ROCHA DE FARIAS

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2012

CRISTIANE ROCHA DE FARIAS

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

CRISTIANE ROCHA DE FARIAS

Avaliação da Imunidade protetora induzida com antígeno bruto e purificado de *Taenia crassiceps* contra cisticercose murina

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Farmácia

Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

São Paulo
2012

A meus pais, com amor, admiração e retribuição a todo o carinho, atenção, dedicação e muito empenho distribuído por toda a minha vida. Que os meus futuros filhos possam conviver com estas pessoas incríveis e que eu possa ser o espelho de todo este aprendizado.

AGRADECIMENTO

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

A meu noivo, ***Fábio Roberto Cantarani***, que embora tenha surgido na minha vida próximo à finalização deste estudo, me proporcionou tranquilidade, carinho e realmente mostrou-se o companheiro ideal para este e todos os outros momentos de minha vida.

A meu orientador de doutorado, **Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida**, agradeço pelos ensinamentos, pela paciência, pelo convívio, pela amizade e por ter contribuído em minha formação profissional, principalmente em um momento que eu tanto precisei. Agradeço por aceitar este convite. As suas virtudes e a sua postura ética complementaram o modelo de profissional farmacêutico que aprendi ao longo dos anos de pós-graduação.

À minha orientadora, principalmente de vida, além de mestrado e parcialmente de doutorado, ***Profa Dra Adelaide José Vaz***, pelos anos de convívio, ensinamentos e conselhos que fizeram toda a diferença para os meus dias. Gostaria de tê-la próxima, por ainda longos e felizes anos, mas, os anjos de Deus quiseram tê-la junto a eles com uma pressa, que só poderia ser explicada pelo fato de você já ter contribuído demais com as pessoas aqui na Terra. Agora, deve ser o momento de você aprender com outros ainda melhores e contribuir em outro plano espiritual. Minha eterna gratidão. Repito que espero ser como você “quando crescer” e aguardarei por um futuro reencontro muito feliz. Nunca vou te esquecer!

Ao ***Programa de Pós Graduação em Farmácia (FCF/USP)*** pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional.

À ***equipe “cisticercótica”:*** Noeli, Alessandra, Andréia, Fabiana, Rosa e Elói. A saudade do convívio de todos os dias estará sempre comigo, porém, os momentos agradáveis e felizes, deste tempo que já passou, sempre será uma lembrança confortante da falta que sinto de todos vocês.

Ao ***Prof. Dr. Nilton Lincopan*** e ***Profa Dra Ana Maria Carmona-Ribeiro*** pela utilização dos adjuvantes alternativos: DODAB e PSS/DDA.

À ***pós-doutoranda Dra Fabyana Maria dos Anjos*** e ***Prof. Dr. Ernani Pinto*** pela utilização do anticorpo monoclonal anti-microcistina, pelo apoio em diversos momentos do trabalho e pelos bons momentos durante todos estes anos.

Ao ***Prof. Dr. José Antônio Livramento, Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado****, e* ***Prof Dr Osvaldo Massaiti Takayanagui*** por encaminhar as amostras de soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes com neurocisticercose ao Laboratório de Imunologia Clínica, embora não utilizadas neste trabalho, foram essenciais para os resultados obtidos pelo grupo, por mais de uma década.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

À **Profa Dra Irene da Silva Soares**, por presidir minha banca de qualificação de doutorado, agradeço o auxílio neste e em outros momentos durantes estes anos de pós-graduação.

À **Profa Dra Kioko Takei**, pela troca constante de conhecimentos, companheirismo, experiência de vida, além, de dividir conosco, pós-graduandos, dias e momentos felizes.

Ao **Prof. Dr. Jorge Camilo Flório** e ao **Prof. André Rinaldi Fukushima** pelo auxílio com as análises estatísticas. A vida me presenteou com dois novos amigos.

A meus **amigos e familiares**, que compreenderam que distância não é sinônimo de falta de carinho. A verdadeira amizade é cultivada no coração.

A todos aqueles que me impulsionaram profissionalmente e pessoalmente, meus sinceros agradecimentos. Espero poder recompensá-los ao longo da vida.

“Enquanto reza, vá fazendo”
Provérbio Africano

RESUMO

FARIAS, C. R. **Avaliação da Imunidade protetora induzida com antígeno bruto e purificado de *Taenia crassiceps* contra cisticercose murina.** 2012. 140f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A neurocisticercose é a forma mais severa relacionada ao complexo teníase-cisticercose, causada pela *Taenia solium.* Diversas medidas de controle já foram propostas, ressaltando a profilaxia via hospedeiro intermediário com o desenvolvimento de vacinas contra a cisticercose suína, que podem ser previamente avaliadas em um modelo experimental intraperitoneal com cisticercos de *Taenia crassiceps*, em camundongos Balb/c, constituindo a cisticercose murina. No presente trabalho foram avaliados: a resposta imune humoral pela pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps* por teste ELISA e Imunoblot, relação IgG1/IgG2a e, análise dos índices de avidez; a resposta imune celular, de acordo com os resultados de proliferação celular, dosagem de citocinas e teste de hipersensibilidade tardia (HTT) e; o índice de proteção (IP) induzido por antígeno bruto (LV-total) e purificado (18/14) de *T. crassiceps,* com ou sem o auxílio de adjuvantes, sob protocolos de imunização ativa por via subcutânea e oral. Paralelamente à análise de imunização ativa, houve avaliação do protocolo de imunização passiva com anticorpos monoclonais (AcMo) anti-*T. crassiceps*. Foram analisados 19 grupos experimentais divididos em três protocolos de imunização ativa por via subcutânea. No protocolo I foram avaliados três grupos experimentais imunizados com 10µg de 18/14, uma dose, e auxílio dos adjuvantes PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio destes. Os grupos apresentaram IP entre 24,9% e 51,8%. No protocolo II foram analisados nove grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 e diferentes esquemas de adjuvantes: DODAB (IP entre 90,3% e 100,0%), PSS/DDA (IP entre 63,6% e 70,1%) ou $Al(OH)_3$ (IP entre 60,7% e 100,0%). Comparando as concentrações antigênicas, os grupos apresentaram maiores IP quando imunizados com 5 ou 10µg de 18/14. No protocolo III foram analisados sete grupos imunizados com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, com duas ou três doses, em diferentes esquemas de adjuvantes: PSS/DDA e $Al(OH)_3$ ou sem adjuvantes, com IP entre 63,5% e 100,0%. A avaliação da resposta imune humoral dos grupos

imunizados por via subcutânea demonstraram a presença de anticorpos IgG por teste ELISA em todos os grupos imunizados, sem correlação dos índices de reatividade (IR) com os IP. Por imunoblot, foram reconhecidas, pelo menos, as proteínas de 14 e 18 kDa após 15 (T15), 30 (T30) e/ou 60 (T60) dias contados a partir da 1ª dose de imunização. Os grupos imunizados por via subcutânea que apresentaram IP> 90,0% tiveram relação IgG1/IgG2a >1,0 no T30 e <1,0 no T60. Quanto à avaliação da resposta imune celular, 10 dos 12 grupos avaliados por ensaios de proliferação de células obtidas de linfonodos induzidas por 18/14 apresentaram índices de estimulação (IE) positivos, enquanto que o antígeno LV-total demonstrou-se imunossupressor nestes experimentos. A análise de dois grupos imunizados de forma ativa, por via subcutânea, com IP=100%, mostrou o predomínio de citocinas com polarização Th1 (IFN-γ) no T60 e Th2 (IL-4) no T120. Não houve correlação dos IP com os resultados obtidos com HTT, porém, os resultados foram variáveis de acordo com o perfil antigênico e o adjuvante utilizado pela via subcutânea. Sequencialmente foram analisados seis grupos imunizados de forma ativa, por via oral, com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ que apresentaram IP entre 48,3% e 100,0%, sem diferença significativa entre os grupos, exceto com o grupo imunizado com duas doses de 30µg, o qual apresentou 100,0% de IP. No T15 e T30 os IR obtidos em teste ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps* foram entre 0,9 e 2,4, enquanto que no T60 entre 2,6 e 5,1. Por Imunoblot, foram reconhecidas as proteínas de 14, 18, 30 e >40kDa no T60. A relação IgG1/IgG2a foi <1,0 no T30 e no T60, enquanto que HTT foi apresentado <40,0% no T30 e T60. Adicionalmente aos ensaios de imunização ativa, seis grupos de camundongos Balb/c imunizados de forma passiva com anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* apresentaram IP até 93,0%. De acordo com os resultados obtidos, antígenos bruto e purificado de *T. crassiceps* foram considerados promissores para imunização murina, principalmente o 18/14 quando utilizado com DODAB ou hidróxido de alumínio pela via subcutânea. Os mecanismos protetores não foram totalmente elucidados, porém, demonstram polarização para resposta Th1 e proteção parcial dependente de IgG, demonstrada pelos ensaios de imunização passiva.

Palavras-chaves: *Taenia crassiceps*, vacinação, cisticercose, proteção.

ABSTRACT

FARIAS, C. R. **Evaluation of protective immunity induced by crude and purified antigens of *Taenia crassiceps* against murine cysticercosis. 2012. 140p.** PhD Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Neurocysticercosis is the most severe form of infection related to the complex taeniasis-cysticercosis, caused by *Taenia solium*. Several control measures have been proposed, emphasizing the prophylaxis via intermediate host through the development of vaccines against porcine cysticercosis, which may be previously evaluated in an intraperitoneal experimental model using cysticercus of *Taenia crassiceps*, in Balb/c mice, constituting the murine cysticercosis. In this study were evaluated: the humoral immune response by search of anti-*T. crassiceps* IgG antibody by ELISA and Immunoblot assays, IgG1/IgG2a ratio and, analysis of avidity indices; the cellular immune response by proliferation assay, cytokine maeasurements and delayed hypersensitivity assay (DHA) and; protection index (PI) induced by crude antigen (total-VF) and purified (18/14) of *T. crassiceps*, with or without adjuvants, through active immunization protocols by subcutaneous and oral administration. In parallel to the active immunization was performed the evaluation of passive immunization protocol with anti-*T. crassiceps* monoclonal antibodies (AcMo). Were analyzed 19 experimental groups, divided into three active immunization protocols by subcutaneous via. In I Protocol were evaluated three experimental groups which were immunized with 10µg of 18/14 antigen, one dose, with or without PSS/DDA, $Al(OH)_3$ adjuvants. These groups showed PI between 24,9% and 51,8%. In II Protocol were evaluated nine experimental groups which were immunized with 5, 10 or 20µg of 18/14 antigen, using different schemes of adjuvants: DODAB (PI between 90,3% and 100,0%), PSS/DDA (PI between 63,6% and 70,1%) or $Al(OH)_3$ (PI between 60,7% and 100,0%). Comparing the concentrations antigenic, groups had higher IP when immunized with 5 or 10µg of 18/14 antigen. In III Protocol were evaluated seven groups immunized with 20, 40 and/or 60µg of 18/14 antigen, with two or three doses, using also different schemes of adjuvants: PSS/DDA and $Al(OH)_3$ adjuvants or without them, showing PI between 63,5% and 100,0%. The evaluation of humoral immune response of all subcutaneous immunizated groups demonstrated

the presence of IgG antibodies by ELISA in all immunized groups, without correlation between reactivity indices (RI) and PI. By immunoblot, were recognized at least the 14 and 18 kDa proteins after 15 (T15), 30 (T30) and/or 60 (T60) days from the first dose immunization. The groups immunized subcutaneously that showed PI > 90,0% had IgG1/IgG2a ratio >1,0 in T30 and <1,0 at T60. About the cellular immune response evaluation, 10 among 12 groups evaluated by proliferation assays using lymphonodes stimulated with 18/14 antigen showed indices of stimulation (IS) positive, while the VF-total antigen was shown immunosuppressive in these experiments. The analysis of two groups actively immunized subcutaneously with PI equal to 100%, showed predominance of cytokines tending to Th1 (IFN-γ) in T60 time and Th2 (IL-4) in T120 time. There was no correlation between PI indices and the results obtained from the DHA, however, the results varied according to the antigenic profile and the adjuvant subcutaneously used. Sequentially were analyzed six groups actively immunized by oral via, with 10, 20 or 30µg of LV-total, one or two doses, supported by $Al(OH)_3$ adjuvant which showed PI between 48,3% and 100,0%, with no significant difference between the groups, except the group immunized with two doses of 30µg, which had PI of 100,0%. In T15 and T30 times the reactivity indices obtained by ELISA test for the detection of IgG anti-*T. crassiceps* antibodies were between 0,9 and 2,4, while in T60 time they were between 2,6 and 5,1. By Immunoblot, were recognized the 14, 18, 30 and > 40kDa proteins in T60 time. The IgG1/IgG2a ratio was <1,0 in T30 and T60 time, while DHA was presented <40,0% in T30 and T60. In addition to the active immunization assays, groups of six Balb/c mice were passively immunized with anti-*T. crassiceps* monoclonal antibodies and they showed PI up to 93,0%. According to the obtained results, crude and purified antigens of *T. crassiceps* were considered promising for murine immunization, especially when 18/14 antigen was used together with DODAB or aluminum hydroxide subcutaneously. The protective mechanisms have not been fully elucidated, however, showed trend towards Th1 response and dependent partial protection of IgG, as demonstrated by passive immunization assays.

Keywords: *Taenia crassiceps*, immunization, cysticercosis, protection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose causado pela *Taenia solium*.	**24**
Figura 2	Parâmetros de análise referentes ao protocolo I de imunização ativa subcutânea	**51**
Figura 3	Parâmetros de análise referentes ao protocolo II de imunização ativa subcutânea.	**53**
Figura 4	Parâmetros de análise referentes ao protocolo III de imunização ativa subcutânea.	**55**
Figura 5	Parâmetros de análise referentes ao protocolo de imunização ativa oral.	**56**
Figura 6	Parâmetros de análise referentes ao protocolo de imunização passiva.	**58**
Figura 7	SDS-PAGE a 15% com padrão de baixo peso molecular (padrão), antígeno 18/14 (120µg) e LV-total (40µg). Coloração realizada pelo método de Coomansie.	**68**
Figura 8	Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização ativa subcutânea com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante. Dados apresentados por médias ± desvio padrão (barras). Diferença significativa entre os grupos (*).	**70**

Figura 9 Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete (T7) e sessenta (T60) dias contados a partir da imunização com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante. As leituras foram realizadas após 24h e 48h. Dados apresentados por média ± desvio padrão (traço). Diferença significativa entre os dados obtidos dos grupos analisados (*). **73**

Figura 10 Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-T. crassiceps utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$. Dados apresentados das médias ± desvio padrão (barras). Dados entre os grupos com diferença significativa (*). **75**

Figura 11 Dosagem de IL-4, IL-10 e IFN-γ em sobrenadantes de cultura das células obtidas de linfonodos (ly) ou de baço (bç) referentes ao grupo imunizado com 20µg de 18/14 com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ e desafiado (T60), estimulados com antígeno 18/14 ou LV-total por 24h ou 72h. **79**

Figura 12 Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete dias (T7) com leitura após 24h (A) e 48h (B) e sessenta (T60) dias com leitura após 24h (C) e 48h (D) contados a partir da imunização com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. Dados apresentados das médias ± desvio padrão (traço). Dados entre os grupos com diferença significativa (*). **80**

Figura 13 Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização subcutânea com 20, 40 ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes. Dados apresentados por média ± desvio padrão (barras). Dados entre os grupos com diferença significativa (*). **83**

Figura 14 Dosagem de IL-4, IL-10 e IFN-γ em sobrenadantes de células obtidas de linfonodos (A) ou de baço (B) referentes aos grupos imunizados com 20, 40 ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ e desafiados (T60), estimuladas com antígeno 18/14 ou LV-total por 24h ou 72h. **87**

Figura 15 Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete dias (T7) com leitura após 24h (A) e 48h (B), sessenta dias (T60) com leitura após 24h (C) e 48h (D) e cento e vinte dias (T120) com leituras após 24h (E) e 48h (F) contados a partir da imunização com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$. Dados apresentados por média ± desvio padrão (traços). Dados com diferença significativa (*). **89**

Figura 16 Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno LV-total e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização oral com 10, 20 ou 30µg de18/14, uma ou duas doses, com adjuvante $Al(OH)_3$. Dados apresentados por média ± desvio padrão (barras). Diferença significativa entre os grupos (*). **92**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estratégias de intervenção para a prevenção e controle do complexo teníase-cisticercose.	**30**
Tabela 2	Grupos experimentais pertencentes ao protocolo I de imunização ativa subcutânea com 10µg de 18/14, uma dose, com auxílio dos adjuvantes PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 60 dias.	**51**
Tabela 3	Grupos experimentais pertencentes ao protocolo II de imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ e desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias.	**52**
Tabela 4	Grupos experimentais pertencentes ao protocolo III de imunização ativa subcutânea com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose de imunização.	**54**
Tabela 5	Grupos experimentais pertencentes ao protocolo de imunização ativa oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ e desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose de imunização.	**56**
Tabela 6	Grupos experimentais pertencentes ao protocolo de imunização passiva com 50 a 250µg de anticorpos monoclonais (AcMo) anti-ES-Tcra ou anti-microcistina.	**58**
Tabela 7	Índices de avidez e relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante.	**70**

Tabela 8 Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias. **71**

Tabela 9 Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de18/14 ou LV-total obtidas dos grupos imunizados com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante. **72**

Tabela 10 Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafio com dez cisticercos de *Taenia crassiceps* após 60 dias da dose vacinal. **74**

Tabela 11 Índices de avidez e relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* das amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. **76**

Tabela 12 Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias. **77**

Tabela 13 Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de 18/14 ou LV-total obtidas dos grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. **78**

Tabela 14 Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20ug de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ e desafio com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias. **81**

Tabela 15 Índices de avidez e relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes. **84**

Tabela 16 Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias. **85**

Tabela 17 Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de18/14 ou LV-total referentes aos grupos imunizados com 20 ou 40µg de 18/14, duas doses, em $Al(OH)_3$. **86**

Tabela 18 Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafio com cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose. **90**

Tabela 19 Relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados por via oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o adjuvante $Al(OH)_3$. **93**

Tabela 20 Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* das amostras de soro de camundongos imunizados por via oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o adjuvante $Al(OH)_3$, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) ou 60 (T60) dias. **93**

Tabela 21 Índices de proteção obtidos após imunização ativa oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ e desafio com cisticercos de *Taenia crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose. **94**

Tabela 22 Índices de proteção obtidos após imunização passiva com anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra e anti-microcistina. **95**

Tabela 23 Dados obtidos com os protocolos de imunização ativa e passiva referentes a pesquisa de anticorpos (IgG), relação IgG1 e IgG2a (IgG1/IgG2a), índice de avidez (avidez), índice de estimulação (IE) e índice de proteção (IP). **96**

LISTA DE ABREVIATURAS

18/14	Antígeno de 18 e 14 kDa de *Taenia crassiceps*
AcMo	Anticorpos monoclonais
ACF	Adjuvante completo de Freund®
AIF	Adjuvante incompleto de Freund®
$Al(OH)_3$	Hidróxido de Alumínio
Anti-ES-Tcra	Anticorpos monoclonais anti - excreção e secreção de *Taenia crassiceps*
DODAB	Partículas de sílica ligadas com fragmentos catiônicos
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
HTT	Teste de hipersensibilidade tardia
IE	Índice de estimulação
IFN-γ	Interferon gama
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IgG2a	Imunoglobulina G subclasse 2ª
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
IP	Índice de proteção
IR	Índice de reatividade
kDa	Kilodalton
LV-total	Antígeno total de cisticercos de *Taenia crassiceps*
Nc	Não consta
NC	Neurocisticercose
PBS	Tampão fosfato salina
PBS-T	Tampão fosfato salina com 0,05% de Tween 20
PSS/DDA	Partículas de poliestireno cationizadas

Relação IgG1/IgG2a	Relação da absorbância de IgG1 sob a absorbância de IgG2a
T	Tempo, contado em dias, referente ao protocolo de imunização
T. crassiceps	*Taenia crassiceps*
T. solium	*Taenia solium*
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**23**
1.1	Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose	**24**
1.2	Aspectos clínicos do complexo teníase-cisticercose	**27**
1.3	Medidas de controle do complexo teníase-cisticercose	**28**
1.3.1	Diagnóstico e tratamento da teníase e cisticercose humana	**30**
1.3.2	Cisticercose suína: inspeção de carnes e tratamento	**33**
1.3.3	Vacinas: estratégias de controle para infecções	**35**
1.3.3.1	Adjuvantes	**37**
1.3.3.1.1	Compostos de alumínio	**38**
1.3.3.1.2	Materiais particulados	**40**
1.3.3.1.3	Emulsões	**41**
1.3.3.1.4	Lipossomas	**41**
1.3.3.2	Antígenos de *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*	**42**
1.4	Resposta imunoregulatória na cisticercose	**45**
2	**OBJETIVOS**	**47**
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	**48**
3.1	Parasitas e antígenos	**48**
3.1.1	Análise dos extratos antigênicos	**48**
3.2	Protocolos de imunização	**49**
3.2.1	Protocolos de imunização ativa	**49**

3.2.2	Adjuvantes	**50**
3.2.3	Protocolos de imunização ativa subcutânea	**50**
3.2.3.1	Protocolo I - Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias	**50**
3.2.3.2	Protocolo II- Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias	**52**
3.2.3.3	Protocolo III- Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.	**54**
3.2.4	Protocolo de imunização ativa oral	**56**
3.2.5	Protocolo de imunização passiva	**57**
3.3	Avaliação da resposta imune	**59**
3.3.1	Avaliação da resposta imune humoral	**59**
3.3.1.1	ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti- *T. crassiceps*	**59**
3.3.1.2	Avaliação do índice de avidez	**61**
3.3.1.3	Imunoblot	**61**
3.3.2	Avaliação da resposta imune celular	**62**
3.3.2.1	Teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT)	**62**
3.3.2.2	Linfoproliferação	**63**
3.3.2.3	Dosagem de citocinas	**65**
3.4	Índices de proteção	**66**
3.5	Análise estatística	**66**

4	**RESULTADOS**	**68**
4.1	Antígenos	**68**
4.2	Protocolos de imunização ativa subcutânea	**69**
4.2.1	Protocolo I - Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias	**69**
4.2.1.1	Avaliação da resposta imune humoral	**69**
4.2.1.2	Avaliação da resposta imune celular	**71**
4.2.1.3	Índices de proteção	**74**
4.2.2	Protocolo II- Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias	**74**
4.2.2.1	Avaliação da resposta imune humoral	**75**
4.2.2.2	Avaliação da resposta imune celular	**78**
4.2.2.3	Índices de proteção	**81**
4.2.3	Protocolo III- Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.	**82**
4.2.3.1	Avaliação da resposta imune humoral	**82**
4.2.3.2	Avaliação da resposta imune celular	**85**
4.2.3.3	Índices de proteção	**90**
4.3	Protocolo de imunização ativa oral	**91**
4.3.1	Avaliação da resposta imune humoral	**91**
4.3.2	Índices de proteção	**94**
4.4	Protocolo de imunização passiva	**95**

4.5	Protocolos de imunização ativa e passiva: dados resumidos	**96**
5	**DISCUSSÂO**	**97**
5.1	Antígenos	**98**
5.2	Protocolos de imunização ativa subcutânea: Avaliação da resposta imune humoral	**100**
5.2.1	Pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps*	**101**
5.2.2	Relação IgG1 e IgG2a	**105**
5.3	Protocolos de imunização ativa subcutânea: avaliação da resposta imune celular	**107**
5.4	Protocolos de imunização ativa subcutânea: Análises dos índices de proteção	**113**
5.5	Protocolo de imunização ativa oral	**115**
5.6	Protocolo de imunização passiva	**117**
6	**CONCLUSÕES**	**120**
7	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	**122**
8	**ANEXO**	**140**

1- INTRODUÇÃO

Infecções parasitárias estão presentes em todo o mundo, principalmente em países em que a precariedade das condições sociais, econômicas, sanitárias e culturais favorece a persistência de parasitoses intestinais e teciduais (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE, 2002). Destaca-se o complexo teníase-cisticercose, considerado um problema de saúde pública causado pela *Taenia solium* (*T. solium*) e responsável por importante impacto em termos de morbidade e mortalidade da população atingida, principalmente quando associado à neurocisticercose (NC) humana, presença de cisticercos no sistema nervoso central (RAMOS JUNIOR et al., 2004).

Os itens a seguir comentados salientam o perfil epidemiológico e clínico do complexo teníase-cisticercose, principais medidas profiláticas e de controle, até o momento desenvolvidas, para que a partir deste ponto possa-se destacar a importância para o desenvolvimento de vacinas com potencial imunogênico e protetor para a aplicação em suínos, a fim de controlar o complexo parasitário.

Este trabalho é constituído na avaliação da imunidade protetora induzida por antígeno bruto e purificado de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) em um modelo experimental de cisticercose murina, em camundongos Balb/c, de pequeno porte, por inoculação intraperitoneal de cisticercos de *T. crassiceps,* para a análise da resposta imune celular, resposta imune humoral e índice de proteção dos grupos experimentais. Os dados apresentados foram considerados promissores para a avaliação futura, inicialmente experimental, no hospedeiro intermediário natural do complexo teníase-cisticercose, causado por *T. solium*, o suíno, a fim de interferir no ciclo biológico do parasita e, desta maneira, diminuir indiretamente o número de casos de NC humana, forma mais severa da doença.

1.1- Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose

O homem é considerado o hospedeiro definitivo da *T. solium* e após a ingestão dos cisticercos contidos em carne de suíno infectado, crua ou mal cozida, pode desenvolver no intestino delgado a fase adulta do parasita, constituindo a teníase. Uma vez a teníase desenvolvida, ovos embrionados podem ser depositados no ambiente, propiciando desta maneira, a continuação do ciclo (figura 1). Os suínos, ou acidentalmente o próprio homem, ao ingerir os ovos viáveis, presentes em alimentos ou água contaminada com material fecal, desenvolvem a cisticercose, que é a presença de cisticercos em tecidos ou órgãos (VAZ; LIVRAMENTO, 1996). Os cisticercos de *T. solium* podem alcançar qualquer tecido, porém, apresentam um grande tropismo pelo sistema nervoso central (79,0% a 96,0%), podendo desenvolver assim, a NC, que é a forma mais grave da doença (AGAPEJEV, 2003).

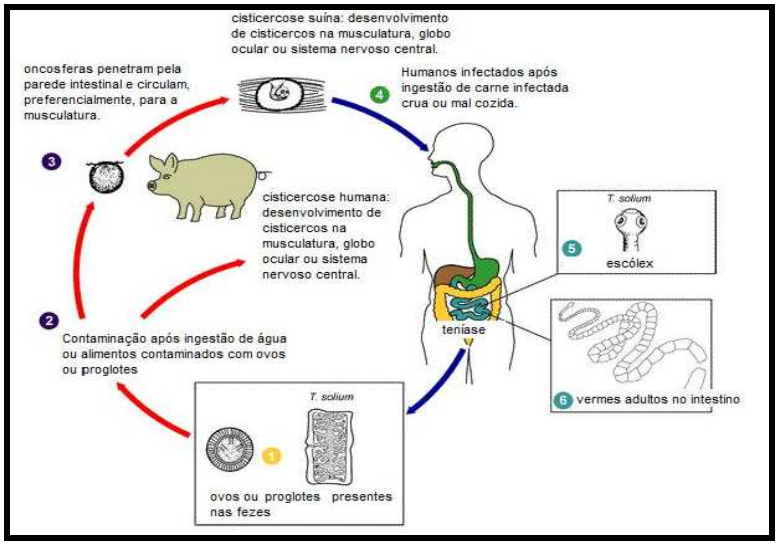


Figura 1- Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose causado pela *Taenia solium*.
Fonte: Centro para controle de prevenção de doenças, 2012 (adaptado).

A cisticercose é uma zoonose universal, porém, apresenta uma distribuição mais frequente em países da América Latina, África e Ásia (SILVA-VERGARA et al., 1995). Durante o último século, as informações epidemiológicas das infecções humanas foram baseadas principalmente em autópsias, sendo o Brasil, a Colômbia, o México e o Peru, claramente apontados como locais prevalentes (FLISSER et al., 2003). Outros autores apresentaram ainda, relevantes estudos epidemiológicos sobre diversos países, como a Bolívia (NICOLETTI et al., 2005), Brasil (AGAPEJEV,

2003; BRAGAZZA et al., 2002; RAMOS JUNIOR et al., 2004), Indonésia (WANDRA et al., 2005), Peru (HUISA et al., 2005) e Venezuela (MEZA et al., 2005), demonstrando a presença do complexo teníase-cisticercose nestes locais.

A NC não é frequente em países, como o Japão e o Canadá, entretanto, os países que recebem grande quantidade de imigrantes provindos de regiões endêmicas, como é o caso dos Estados Unidos, devem incluir em seus programas de saúde, os cuidados necessários para o controle desta parasitose (SCHANTZ et al., 1993; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Analisando os artigos que destacam os dados epidemiológicos brasileiros, a cisticercose humana está presente principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, sendo os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo, considerados endêmicos para NC. Entretanto, este panorama pode não refletir a realidade, visto que em algumas regiões do país, pouco se investiga o complexo parasitário (RAMOS JUNIOR et al., 2004). No Brasil, os casos de NC correspondem a 0,3%, de acordo com os critérios clínicos e a 2,3%, de acordo com a especificidade sorológica, das admissões em hospitais gerais (AGAPEJEV, 2003).

Os fatores que favorecem a permanência das áreas endêmicas são muitos e complexos, destacando o baixo nível socioeconômico da população e a precariedade das condições sanitárias, com estreita relação com os hábitos de higiene pessoal, familiar e ambiental, visto que 22,0% a 34,0% dos pacientes com NC apresentam histórico de teníase familiar, embora a positividade dos exames coproparasitológicos seja extremamente baixa, dificultando o diagnóstico e o tratamento destes indivíduos, transmissores em potencial do parasita (AGAPEJEV, 2003; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

No Brasil, a falta de notificação compulsória; a presença de poucos estudos sistematizados e comparáveis da distribuição epidemiológica nas diferentes regiões do país; a problemática encontrada no diagnóstico clínico, diagnóstico laboratorial e tratamento dos pacientes, relacionada com a dificuldade da associação dos sintomas, alto custo dos exames de imagem e o acesso ao sistema de saúde, em geral, com os pacientes tratados e acompanhados em grandes centros urbanos; resultam na dificuldade da caracterização epidemiológica do complexo parasitário e assim, da implantação de medidas profiláticas e de controle (RAMOS JUNIOR et al., 2004; SILVA-VERGARA et al.,1995; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Ribeirão Preto, São Paulo, foi a cidade pioneira de notificação compulsória para cisticercose humana. Segundo Takayanagui e Leite (2001), a prevalência de NC entre 1992 e 1999 foi de 74 casos/100.000 habitantes, apresentando 21,0% 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.

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, 30,0% dos suínos podem estar contaminados (GONZALEZ et al., 1990).

No Brasil, entre 1996 e 2004 foram registrados 114 surtos de cisticercose suína, contemplando 995 animais contaminados e 46 mortes causadas pelo parasita. Não foram registradas medidas profiláticas ou de controle direcionadas para a região atingida (ORGANIZAÇÂO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL, 2012). Estes dados podem ainda não corresponder ao real número de casos no país, visto que devido aos problemas socioeconômicos presentes no país, a proposta para muitos criadouros é para consumo familiar ou, considerados ilegais e ainda assim destinados para uso comercial, diminuindo, desta maneira, as representações estatísticas.

Nas Américas, entre 1996 e 2004, 13 países apresentaram registros de surtos de cisticercose suína, sendo estes: Bolívia, Brasil, Colômbia, Cuba, El Salvador, Equador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Peru e República Dominicana, sendo El Salvador, o país com maior número de registros de surtos (1945 surtos em 2004) registrados em um mesmo ano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SÁUDE ANIMAL, 2012). Países em que o consumo da carne suína é regrado por aspectos religiosos, pode-se verificar mais facilmente o controle sobre os casos de teníase, porém, os casos de cisticercose continuadamente são mantidos (SCHANTZ et al., 1992).

1.2- Aspectos clínicos do complexo teníase-cisticercose

A teníase, forma intestinal do complexo parasitário, é representada pela presença do verme adulto de *T. solium* desenvolvido após a ingestão de cisticercos contidos em carne de suíno previamente contaminada. Os sintomas associados com teníase geralmente são inespecíficos e incluem alterações do apetite, dores estomacais e abdominais, diarréia, vômito, constipação ou ainda, como na maioria dos casos, pode ser assintomática (SONG; KIM; LEE, 2004).

A cisticercose consiste no desenvolvimento de cisticercos no globo ocular, tecido subcutâneo, músculos ou ainda no sistema nervoso, forma mais grave do complexo teníase-cisticercose (GARCIA et al., 2003). Os locais de maior acesso do cisticerco no sistema nervoso humano incluem as leptomeninges, 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 da NC pode ocorrer dias, meses ou anos após a infecção, dependendo da localização, do tamanho, da forma, do número dos cisticercos viáveis ou calcificados presentes e ainda, da resposta imunológica do hospedeiro (RAHALKAR, 2000), além de variáveis nutricionais e genéticas, tanto do hospedeiro quanto do parasita (AGAPEJEV, 2003; ITO et al., 2006; NASH, 2003). Assim, a diversidade na sintomatologia demonstrada pelos pacientes com NC é o resultado de uma resposta imune que é imprevisível e individual, variando de uma completa tolerância a uma intensa resposta ao parasita (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998).

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, resultando em um edema. Ocorre ainda a liberação maciça de antígenos, grande quantidade de anticorpos, formação de imunocomplexos e exacerbação do processo inflamatório (RAHALKAR, 2000).

A NC ocorre predominantemente entre indivíduos de 21 a 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).

As apresentações clínicas mais freqüentes na NC são: epilepsia, meningite, quadros psíquicos e demenciais e hipertensão intracraniana, este último responsável pela elevada letalidade, refletindo em um coeficiente de letalidade, constatado em diferentes serviços, variando de 16,4% a 25,9% (AGAPEJEV, 2003; MACHADO; PIALARISSI; VAZ, 1988; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001;). Ocorrem também com freqüência: dores de cabeça, tonturas, vômitos e variações de pulsação e de respiração (NEVES, 2000).

1.3- Medidas de controle do complexo teníase-cisticercose

Em 1993, a Força Tarefa Internacional para a Erradicação de Doenças selecionou seis entre 100 doenças consideradas como potencialmente erradicáveis que incluem: poliomielite, sarampo, rubéola, filariose, dracunculiases (doença desenvolvida por parasitas presentes em Guinés) e cisticercose. A erradicação da cisticercose foi considerada possível baseando-se em alguns conceitos: (1) o envolvimento dos seres humanos no ciclo biológico da *T. solium* é apresentado como hospedeiro definitivo, (2) a presença do verme adulto em seres humanos ocorre apenas após a infecção via hospedeiro intermediário, o suíno, (3) a transmissão entre humanos e suínos pode ser controlada e (4) não existe reservatório selvagem para esta infecção (FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006).

Antes de serem implantados os programas de erradicação de doenças, assim como os de profilaxia e de controle, 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 para a avaliação das áreas endêmicas (DIAZ et al., 1992) e a carência de infra-estrutura higiênico-sanitária (SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993) fazem com que os programas de erradicação ainda sejam

considerados inviáveis para os países em desenvolvimento, como o Brasil, necessitando da continuidade dos estudos e o desenvolvimento de novas estratégias para o controle do parasita.

Há décadas que a implantação de medidas de controle, como: o diagnóstico precoce da teníase, o uso de medicamentos, o desenvolvimento do saneamento básico e a inspeção rigorosa das carnes suínas são sugeridas para o complexo teníase-cisticercose (FLISSER et al., 2004; GARCIA et al., 2002). Embora, as medidas apresentadas sejam relevantes, a doença continua sendo prevalente em diversas partes do mundo, salientando assim, o desenvolvimento de outras medidas alternativas. Sugerem-se o efetivo saneamento básico e educação sanitária, controle da água consumida, desenvolvimento de vacinas e o tratamento de suínos utilizando dose-única de antiparasitários, devido ao risco da continuidade do ciclo com este hospedeiro (GARCIA et al., 2002; GARCIA et al., 2007). O tratamento em massa da teníase humana seria outra proposta ainda considerada, porém, aspectos importantes poderiam ser negligenciados, como: as re-infecções e a contaminação remanescente do solo, que levariam anos para a estabilidade (GONZALEZ et al., 2003).

Vantagens e desvantagens podem ser relacionadas com as medidas profiláticas e de controle sugeridas, que devem ser consideradas dependendo do desenvolvimento do país, das condições econômicas, do nível educacional dos habitantes e da prevalência do complexo parasitário na região. Na tabela 1 estão apresentadas as principais estratégias de intervenção para o complexo teníase-cisticercose e as respectivas vantagens e desvantagens.

Tabela 1- Estratégias de intervenção para a prevenção e controle do complexo teníase-cisticercose.

ESTRATÉGIA DE INTERVENÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Tratamento da teníase humana	Altamente efetiva. Resultados imediatos. Remoção dos fatores de risco para a saúde dos doentes. Interrupção da retransmissão.	Requer tratamentos repetitivos devido à possibilidade de recontaminação. Suscetibilidade de novo contato em imigrações. Risco medicamentoso para pacientes com cisticercose.
Tratamento da cisticercose suína	Altamente efetiva. Resultados imediatos.	Contribui para o comércio informal de carnes suínas.
Educação sanitária	Benefícios relacionados com a profilaxia do complexo parasitário e outras doenças relacionadas com transmissão fecal-oral. Possibilidade de erradicação.	Ineficiente como única estratégia. Suscetibilidade de contato em imigrações.
Vacinação para suínos	Proteção em longo prazo. Possibilidade de monitorização.	Avaliação não imediata. Não afeta o comércio informal de carne suína.

Fonte: Lightowlers, 1999.

1.3.1- Diagnóstico e tratamento da teníase e cisticercose humana

A detecção precoce da forma adulta ou de ovos de *T. solium* em humanos foi considerada como uma estratégia viável para o controle do complexo teníase-cisticercose pela Organização Mundial de Saúde. A técnica clássica constitui da pesquisa de material parasitológico (ovos ou proglotes) em fezes humanas, porém, apresenta baixa sensibilidade e especificidade, devido à excreção natural de poucos ovos nas fezes durante a infecção, além da similaridade microscópica entre os ovos de *T. solium* e *Taenia saginata,* o que requer a diferenciação pelos proglotes maduros e escólex (ALLAN et al., 2003). A obtenção dos proglotes em fezes humanas pode ser facilitada com a utilização de anti-helmínticos, porém, o uso destes medicamentos pode causar desintegração na porção terminal e escólex do parasita (ALLAN; CRAIG, 2006).

Na tentativa de aprimorar o diagnóstico laboratorial dos casos de teníase, outras metodologias para a pesquisa de coproantígenos foram desenvolvidas, tais como: por princípios de imunoprecipitação (BABOS; NEMETH, 1962) até

imunoenzimáticos, como o DOT-ELISA (ALLAN et al., 1993) e ELISA (ALLAN et al., 1996), porém, o tratamento prévio das amostras de fezes humanas com uma solução detergente é considerada uma desvantagem em sua utilização, além, da possibilidade de reatividade cruzada na detecção de antígenos presentes entre o gênero Taenidae, como em: *T. solium*, *Taenia saginata*, *Taenia hydatigena* e, outros gêneros. Quando analisados em larga escala, alguns métodos imunoenzimáticos variaram entre 98,0% e 100,0% de sensibilidade e entre 99,2% e 100,0% de especificidade, enquanto que a análise microscópica entre 0,0% e 100,0%, ou seja, confirmando o conceito de baixa sensibilidade deste último método para o diagnóstico laboratorial (ALLAN; CRAIG, 2006).

A pesquisa de anticorpos anti-*T. solium* foi citada por diferentes autores na tentativa de cooperar para o diagnóstico dos pacientes com teníase. Handali et al. (2010) desenvolveram um teste imunocromatográfico utilizando os antígenos recombinantes rES33 e rT24H baseados em antígenos de excreção e secreção de *T. solium*, obtendo sensibilidade e especificidade, respectivamente de 94,5% e 96,0%. Estes testes possuem como desvantagem a reatividade cruzada presente principalmente entre as doenças causadas pela *T. solium* (teníase, cisticercose e NC) e *Echinococcus granulosus,* dificultando a diferenciação laboratorial entre estas apresentações clínicas (ISHIDA et al., 2003), porém, possui como principal vantagem o uso de uma única amostra de soro humano.

Para o controle dos casos de teníase, o diagnóstico precoce é considerado o ponto chave, visto que após a descoberta do caso, o tratamento pode ser direcionado pelo clínico e assim, inibir a continuidade do ciclo parasitário com possibilidade de transmissão dos ovos de *T. solium* que podem desencadear a cisticercose ou a forma mais grave, a NC.

O diagnóstico prévio e tratamento dos casos de NC não são considerados uma forma definitiva para o controle do complexo teníase-cisticercose, visto que a cisticercose humana é considerada uma doença não transmissível, porém, pode direcionar para um acompanhamento clínico e medicamentoso paliativo, a fim de amenizar possíveis sinais e sintomas ou ainda diminuir as possíveis seqüelas.

A análise de líquido cefalorraquiano inclui a eosinofilorraquia e a positividade da reação da fixação de complemento, ou ainda em técnicas desenvolvidas nas últimas décadas, como: ELISA ou Imunoblot (ESPINDOLA et al., 2005; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; TSANG; BRAND; BOYER, 1989).

Testes sorológicos padronizados por diferentes pesquisadores demonstraram variação de reatividade, dependendo do perfil antigênico e da técnica empregada. Espindola e colaboradores (2005), ao padronizar um teste ELISA com antígenos de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps* para pesquisa de anticorpos, obtiveram sensibilidade e especificidade de 100,0%, considerado, portanto, uma alternativa viável para o diagnóstico da NC.

No início da infecção, os cistos viáveis aparecem como uma lesão esférica na tomografia computadorizada e como uma vesícula líquida pela ressonância magnética. Ambos os exames de imagem podem demonstrar a invaginação do escólex. Na fase degenerativa do cisto, este apresenta uma forma contrastada (ITO et al., 2006).

Atualmente, a tomografia computadorizada e a análise do líquido cefalorraquiano são considerados os melhores exames para a determinação diagnóstica da NC (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001). A ressonância magnética é mais sensível do que a tomografia computadorizada quando se refere ao reconhecimento do edema perilesional, cisticercos cisternais e intraventriculares, mudanças degenerativas do parasita, assim como para localizar pequenos cistos em ventrículos, barreiras hematopoiéticas, cerebelo, além das formas racemosas, enquanto que a tomografia computadorizada é mais sensível para detectar calcificações (ITO et al., 2006; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

No século XX, diversos fármacos foram propostos para o tratamento dos casos de teníase, tais como: Timol (1912), Tetracloreto de carbono (1931), Quinina (1933), Diclorofeno (1956), Mebendazol (1975) ou Aminocidina (1979), porém, apresentam baixa tolerância ou eficiência (PAWLOWSKI, 2006). O tratamento pode ser guiado com a utilização de niclosamida em dose única (2g por via oral) que não é absorvida pela mucosa intestinal e assim, não atua nos casos de NC simultaneamente, o que poderia influenciar negativamente no prognóstico da doença, além, de ter um valor acessível (aproximadamente $0,10 por dose) (MONTESOR; PALMER, 2006). Outro medicamento é o praziquantel, porém, ultrapassa a barreira hemato-encefálica, o que pode desencadear como efeito adverso a NC sintomática. O clínico deve avaliar o tipo de tratamento mais adequado para o caso do paciente (PAWLOWSKI, 2006).

O tratamento da NC pode incluir agentes cisticidas (albendazol e praziquantel), para provocar a morte do parasita; corticosteróide, para diminuir ou prevenir a resposta inflamatória, anti-epilepticos (fenitoína e carbamazepina), para prevenir ou

diminuir a severidade e o número das alterações epilépticas; e procedimentos cirúrgicos, para remover o cisto ou para amenizar a hidrocefalia; sendo necessária análise individual de cada caso clínico (SINHA; SHARMA, 2009).

Alguns argumentos contra o uso de agentes cisticidas, albendazol, praziquantel, devem ser considerados, como: risco imediato de uma inflamação aguda pela morte do parasita, aumento das crises epilépticas e tratamento desnecessário, visto que o parasita morre em um período curto de tempo (SINHA; SHARMA, 2009).

Procedimentos cirúrgicos podem ser indicados nos casos de: presença do cisto exibindo compressão local do cérebro ou nervos cranianos; edema refratário (pseudotumor) para tratamento médico; cisticercose intraventricular; hipertensão intracraniana; cisticercose espinal, com compressão ou cistos oculares (SINHA; SHARMA, 2009).

1.3.2- Cisticercose suína: inspeção de carnes e tratamento

A inspeção de carnes suínas para o controle do complexo teníase-cisticercose ocorre pela avaliação *post-mortem* de músculos mastigatórios (masseter e pterigóide), coração e língua, que pode não identificar animais com baixa infecção (SOARES et al., 2006). Este perfil de inspeção sanitária apresenta cerca de 70,0% de sensibilidade, reduzindo o risco de transmissão, principalmente quando os suínos apresentam alta carga parasitária (PHIRI et al., 2002).

Na tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade da inspeção de suínos contaminados por *T. solium*, principalmente quando apresentam baixa carga parasitária, sendo este o desafio para diagnóstico, diversos autores padronizaram testes para a pesquisa de antígenos ou de anticorpos por técnicas imunoenzimáticas (GOMES et al., 2007; GONZALEZ et al., 1990), porém, embora os resultados tenham sido apresentados como promissores, ainda são necessárias novas padronizações para o controle efetivo da cisticercose suína.

O controle da carne suína é dificultado pela própria sensibilidade das técnicas disponibilizadas e ainda pela presença de criadouros informais ou clandestinos nos países em desenvolvimento que não realizam nenhum tipo de inspeção antes da

venda. Esta prática torna-se de difícil controle, visto que o preço deste produto geralmente é menor do que o da carne legalizada ou ainda, as carnes contaminadas geralmente são vendidas para fabricação de salsichas ou demais produtos processados de forma ilegal, visto a facilidade de incorporação deste tipo de carne nestes produtos (GONZALEZ et al., 2003).

No Brasil, o controle da criação e da industrialização de suínos é fundamentado por legislações como a portaria 711 de 01 de novembro de 1995 que estabeleceu a inspeção da cabeça e papada antes da evisceração, a fim de verificar a possibilidade de constatação de lesões, relacionadas com doenças como a cisticercose e tuberculose, o que virá a determinar não só um exame mais acurado para estas infecções, como também a separação destas peças e identificação, a fim de serem excluídas com a respectiva carcaça até a inspeção final. Para cisticercose, acrescenta-se ainda a inspeção do cérebro (exploração em corte sagital), palpação e visualização do epicárdio (em água morna a 38º/40ºC) e, palpação da língua e análise em corte longitudinal. Os abatedouros devem conter um livro mensal de anotações diárias das localizações dos casos de cisticercose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012).

Mesmo que existam legislações que indiretamente auxiliam na prevenção do complexo teníase-cisticercose em criadouros destinados para a produção de alimentos a base de carne, a criação clandestina pode prejudicar este controle. Os criadouros ilegais e, portanto, não inspecionados, devem cooperar com a continuação dos casos de teníase, que podem representar o histórico familiar de 22,0% a 34,0% dos pacientes com NC (AGAPEJEV, 2003; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

O decreto 1255 de 25 de junho de 1962 atribuiu regulamentos para inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, sendo permitido, apenas o aproveitamento de tecidos adiposos dos animais com cisticercose (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2012). Alguns manuais, mais recentes, auxiliam o manuseio de suínos pelos criadouros, como o Manual de Boas Práticas de Produção de Suínos, onde são detalhadas as técnicas de planejamento da atividade, manejo, reprodução, alimentação e controle sanitário no país (AMARAL et al., 2006).

O tratamento da cisticercose suína poderia ser explorado como uma medida de controle para o complexo teníase-cisticercose, devido ao risco do consumo por

humanos da carne suína previamente contaminada por cisticercos de *T. solium* e assim, continuar o ciclo com o desenvolvimento do parasita adulto. Anti-helmínticos de amplo espectro, utilizados para tratamento em humanos, já foram empregados em experimentos para o controle da cisticercose suína, como o albendazol, praziquantel, flubendazol e oxfendazol (sulfóxido de benfendazol), sendo parcialmente efetivos, com cinética parcialmente conhecida para suínos, além da vantagem do uso por via oral (PENICHE-CARDENÃ et al., 2002). Tratamento com oxfendazol possui baixo custo e pode proteger os suínos por até dois anos após a sua administração, porém, apresenta baixa efetividade, visto que são necessários, pelo menos, três meses de tratamento para a calcificação completa dos cisticercos (GARCIA et al., 2007; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003).

Uma alternativa de tratamento seria a utilização de antiparasitários injetáveis, para uso veterinário. Peniche-Cardeña e colaboradores (2002) avaliaram a utilização de sulfóxido de albendazol (Ricobendazol®) em suínos com cisticercose, sendo sua farmacocinética ainda não conhecida para estes animais, mas sim, para ruminantes. Sua ação é mediada pela inibição da captação de glicose pela membrana parasitária, diminuindo assim a obtenção de energia e ocasionando a morte do parasita. O tratamento por 12 semanas, 15mg/kg foi considerado 100,0% efetivo para o controle dos cisticercos, sendo, portanto, uma alternativa viável.

O tratamento em massa dos suínos poderia inicialmente, ser sugerido como uma alternativa para o controle do complexo teníase-cisticercose, porém, uma problemática para a implementação seria o próprio custo, que embora baixo, torna-se um obstáculo para convencer os criadores ao pagamento, principalmente os locais ilegais, visto que os cistos morrem após o cozimento ou congelamento (SARTI; RAJSHEKHAR, 2003).

1.3.3- Vacinas: estratégias de controle para infecções

A vacinação é uma das principais ferramentas biotecnológicas utilizadas atualmente para o controle de várias infecções virais e bacterianas. Em contraste, com as infecções causadas por protozoários, vacinas desenvolvidas contra a fase

larvar de helmintos, têm demonstrado uma solução barata e efetiva em condições experimentais (SCIUTTO et al., 2007).

A aplicação de vacinas anti-helmínticas é considerada mais vantajosa para a medicina veterinária do que para a medicina humana, devido a uma combinação de fatores relacionados com o alto potencial econômico vinculado aos produtos veterinários e o requerimento de elevada segurança para produtos destinados ao consumo humano (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE, 2002).

O desenvolvimento de vacinas como medida profilática e de controle pode demonstrar diversas vantagens, como: custo acessível, comparando com os materiais utilizados; ausência de resíduos químicos na carne consumida; medida considerada aceitável pelas comunidades, visto que a aplicação de vacinas pela medicina humana é eficaz e segura; fácil aplicação, sem a necessidade de uma equipe treinada ou de um equipamento específico. As vantagens são as principais razões para o desenvolvimento de vacinas (DALTON; MULCAHY, 2001).

O objetivo das vacinas para suínos é interromper o ciclo parasitário da *T. solium* e desta maneira, indiretamente, eliminar o agente causador da NC (FLISSER et al., 2004; GONZALEZ et al., 2005). Diversos pesquisadores demonstraram promissores resultados no controle da cisticercose suína, porém, o uso de poucos animais e as variáveis presentes durante a contaminação experimental (número de ovos, estado nutricional, idade dos suínos) tornam a análise da eficácia dos antígenos uma complexa tarefa (ALUJA et al., 2005; FLISSER et al., 2004; MANOUTCHARIAN et al., 2004).

Um dos problemas enfrentados no estudo de vacinas contra cisticercose por *T. solium*, é a imunização e acompanhamento de suínos, por se tratar de um animal de porte médio e que apenas pode ser utilizado em laboratório-fazenda de escolas de veterinária, ou institutos de pesquisa de agropecuária. Manter um determinado número desses animais exige uma área grande reservada especialmente para esta finalidade de estudos, e deve ser objeto de estudo apenas após análise dos resultados obtidos em animais de laboratório.

Acredita-se que para o efetivo controle do complexo teníase-cisticercose, seja necessária a combinação de diagnóstico precoce, tratamento para as formas parasitárias remanescentes, educação sanitária e vacinação dos suínos. Adotando-se estas medidas de controle, a erradicação do parasita poderia ser concluída, porém, esta é apenas uma visão futurista de uma estratégia de prevenção, visto que

uma vacina efetiva para o controle da parasitose ainda não está disponível, embora existam resultados promissores (LIGHTOWLERS, 2003).

As estratégias vacinais são baseadas na geração de uma intensa resposta imune a fim de proteger o organismo, preferencialmente por longos períodos, sem causar a morte ou oferecer potencial risco para a saúde do hospedeiro, embora alguns efeitos adversos possam ocorrer de forma local ou sistêmica, como: dor, inflamação local, febre, linfoadenopatia, eosinofilia e anafilaxia. Para esta finalidade geralmente utilizam-se antígenos atenuados, inativados, peptídeos sintéticos ou antígenos recombinantes, necessitando desta maneira de um adjuvante para facilitar a resposta imune (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

1.3.3.1- Adjuvantes

Adjuvantes podem ser utilizados para: (1) aumentar a imunogenicidade de antígenos purificados ou recombinantes, (2) diminuir o número de doses vacinais, (3) aumentar a eficácia de vacinas aplicadas em recém-nascidos, idosos ou indivíduos imunocomprometidos, (4) facilitar a apresentação de antígenos presentes em mucosas, (5) modular a avidez, especificidade, isótipos ou subclasses dos anticorpos, (6) diminuir o número de doses ou ainda, (7) estimular a resposta imune celular, em alguns casos (HAGAN, 2001).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com a forma de administração (por mucosa ou pela via parenteral), pelo mecanismo de ação (imunoestimulantes; carreadores, contendo proteínas que ativam linfócitos T auxiliares; ou vesiculares, lipossomas ou emulsões que são utilizadas como matriz para adsorção de antígenos) ou ainda, por uma classificação mais recente, pelas propriedades fisicoquímicas (base em gel, agentes tensoativos, emulsões oleosas, particulados, produtos bacterianos ou fusão de proteínas ou lipoproteínas) (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

A seleção para a utilização de um determinado adjuvante é baseada no tipo de antígeno, espécie a ser vacinada, via de administração e efeitos desejáveis. O ideal seria que um adjuvante fosse biodegradável, estável por longos períodos, de baixo

custo, além de não induzir ou promover resposta imune contra antígenos próprios (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

1.3.3.1.1- Compostos de alumínio

Os compostos de alumínio incluem o fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e as proteínas precipitadas em alumínio. A adsorção dos antígenos aos compostos de alumínio depende das características químicas e físicas do antígeno e das condições de adsorção, como por exemplo: (1) forças eletrostáticas. Autores relatam que em pH neutro, os sais de hidróxido de alumínio são carregados positivamente e possuem ponto isoelétrico em pH 11, o que favorece a adsorção de proteínas neutras ou negativas, enquanto que os de fosfato de alumínio são carregados negativamente; (2) pH, próximo a 6,0, pode ser considerado um fator importante para a adsorção dos antígenos aos compostos de alumínio, assim como, (3) temperatura, entre 4º C e 45º C; (4) dose de adjuvante e grau de adsorção, visto que o excesso de sais de alumínio pode suprimir a resposta imune ou torna-se tóxico para macrófagos, assim, a dose usual para humanos é em torno de 0,5mg, sendo o limite de 1,25mg pela Organização Mundial de Saúde (GUPTA, 1998).

Na tentativa de diminuir as variáveis que poderiam influenciar negativamente na reprodutibilidade de adsorção, alguns compostos possuem preparações específicas, como: Alhydrogel® (hidróxido de alumínio) e o Adju-Phos® (fosfato de alumínio) (GUPTA, 1998).

Uma das vantagens da utilização dos compostos de alumínio está relacionada com o aumento rápido dos títulos específicos de anticorpos após a primeira dose de imunização, porém, vacinas adsorvidas em compostos de alumínio não demonstram vantagens sobre antígenos solúveis para a resposta secundária (GUPTA, 1998). Outros estudos sugerem que o hidróxido de alumínio pode modificar as funções e fenótipos dos macrófagos estimulados, assim como facilitar a migração de macrófagos específicos para a região para induzir mecanismos celulares, porém, sem interferir na capacidade autóloga de proliferação de linfócitos T de memória (RIMANIOL; GRAS; CLAYETTE, 2007).

Resultados obtidos em experimentos afirmam que no caso de pacientes com doenças crônicas (COUETTE et al., 2009) ou ainda em casos de alterações genéticas associadas com resposta de células T citotóxicas (AUTHIER, 2006), pode haver a permanência por maior tempo do hidróxido de alumínio no local da aplicação ou ainda a interferência nos processos de *clearance* do adjuvante, podendo assim aumentar o risco das lesões.

Outros mecanismos de ação do hidróxido de alumínio envolvem a participação do sistema complemento; a ativação de eosinófilos, o que sugere a utilização em vacinas antiparasitárias; ação de macrófagos e ativação de interleucina (IL-) 1 e outras citocinas inflamatórias, além do estímulo principal da resposta imune humoral, com produção de IgG1, IgE e IL-4 pela ativação de células Th2, além de formação de depósito no local da aplicação. Uma capacidade limitada em estimular uma resposta imune celular, especialmente, linfócitos T citotóxicos, pode comprometer em um primeiro momento para vacinas antivirais ou antiparasitoses intracelulares. Para este perfil de estímulo celular, muitas vezes é necessário, por exemplo, a adsorção de antígenos inativados bacterianos (GUPTA, 1998; PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Geralmente, as vacinas adsorvidas em sais de alumínio são bem toleradas pelo organismo, sendo mais comum a formação de granulomas pela via subcutânea ou intradérmica de inoculação do que pela via intramuscular. Outras limitações podem estar relacionadas com o aumento de IgE, neurotoxicidade e potencial alérgico. Mesmo em condições normais, baixas doses de alumínio podem ser excretadas pelos rins, que em certas situações podem reduzir a função renal e provocar o acúmulo de alumínio no organismo, o que pode afetar o tecido ósseo e o sistema nervoso e assim, causar intoxicações associadas com síndromes neurológicas fatais, demência, esclerose ou doença de Alzheimer (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Algumas limitações podem ser consideradas para a utilização de adjuvantes baseados em sais de alumínio: (1) não são biodegradáveis. Compostos de alumínio foram encontrados no local de inoculação, pela via subcutânea, em camundongos e suínos, após um ano (GUPTA et al, 1997) e (2) não podem ser congelados ou facilmente liofilizados, visto que estes processos podem causar aumento de agregação e precipitação (GUPTA, 1998).

Analisando as vantagens e desvantagens na utilização dos compostos de alumínio, espera-se que estes adjuvantes sejam utilizados ainda por muitos anos, visto o seu custo acessível, imunogenicidade e compatibilidade com diversos antígenos, principalmente aqueles que necessitam como mecanismo protetor, a ativação do sistema imune humoral, porém, outros tipos de adjuvantes devem ser analisados continuamente na tentativa de aumentar o potencial de estímulo de resposta imune de forma seletiva e com menor risco de reações adversas possíveis (GUPTA, 1998).

A algamanulina (1-2µm) é uma combinação de hidróxido de alumínio e γ-inulina (carboidrato obtido de plantas da família *Compositae),* o que provoca um estímulo mais potente Th2. Deol et al. (1995) avaliaram em ovelhas, o potencial de resposta imune celular e humoral induzida pela inoculação de algamanulina e antígenos recombinantes de *Taenia ovis*. Houve indução de resposta celular comparável ao adjuvante completo (ACF) e incompleto (AIF) de Freund®, além de resposta humoral similar aos compostos de alumínio.

1.3.3.1.2- Materiais particulados

Polímeros solúveis ou particulados podem ser utilizados como adjuvantes em vacinas, alguns biocompatíveis e biodegradáveis, e outros como acetato de celulose, aminacarbonatos, microsferas proteinóides, polianidridas, dextran, alginatos e gelatina podem adsorver diferentes tipos de antígenos. Uma das vantagens deste sistema é a capacidade de manipular a cinética de degradação das microesferas pela concentração relativa destes componentes e assim, controlar a liberação do antígeno (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Segura-Velásquez et al. (2006) avaliaram a imunogenicidade da vacina anti-*influenzae* co-administrada com um peptídeo sintético, GK1, obtido a partir do sequenciamento de proteínas imunodominantes de *T. crassiceps.* Os resultados obtidos sugeriram diminuição da inflamação local, aumento dos níveis de anticorpos e diminuição mais rápida da carga viral após infecção, quando comparado a vacina anti-*influenzae* tradicional.

Proteínas recombinantes apresentadas de forma particulada para o sistema imune já foram utilizadas com sucesso na prática profilática. Este é o caso da primeira vacina recombinante utilizada para a prevenção de hepatite B, baseada no antígeno HBsAg. Considerada imunogênica e com potencial de induzir resposta imune celular *in vivo* (SCHIRMBECK et al., 1995).

1.3.3.1.3- Emulsões

Nesta classe estão incluídas algumas preparações clássicas como: (1) ACF, composto de óleo mineral, que inclui o Arlacel A, e micobactérias inativadas e (2) AIF que não contém compostos bacterianos. Estes compostos apresentam alta toxicidade: reação inflamatória, granulomas e formação de úlceras no local da aplicação. AIF ainda é utilizado na imunoterapia de pacientes HIV positivos e vacinas anti-câncer, por estimular com muita propriedade a resposta imune humoral (HAGAN, 2001; PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

1.3.3.1.4- Lipossomas

Lipossomas podem ser vesículas fosfolipídicas utilizadas como sistema para agregação comercial de medicamentos anti-neoplásicos e anti-fúngicos ou partículas sintéticas ligadas a lípides, que podem ser cationizadas (PERRIE et al., 2008). Recentemente, grande variedade de formulações lipossomais está sendo avaliada como adjuvante, incluindo ou não, outras partículas estimulatórias (HAGAN, 2001). As propriedades deste sistema são dependentes do número de partículas lipídicas, carga elétrica, composição e método de preparo. Autores relataram estímulo humoral e celular em resposta a antígenos proteicos e polissacarídicos, além deste sistema ter extenso período de meia-vida, o que favorece a apresentação dos antígenos ao sistema imune após a vacinação (PETROVSKY; AGUILAR, 2004).

Partículas de sulfato de poliestireno cationizadas (PSS/DDA), com 301nm de diâmetro e sensibilizadas com antígeno de 18 e 14 kDa de *T. crassiceps*

estimularam em camundongos Balb/c resposta imune celular e humoral superior a comparada ao do grupo imunizado sob as mesmas condições em adjuvante tradicional, hidróxido de alumínio, suscitando desta maneira a utilização destas partículas para o desenvolvimento de vacinas (LINCOPAN et al., 2007). De forma alternativa, partículas de sílica ligadas com fragmentos catiônicos para a adsorção de proteínas (DODAB), formaram um colóide mais estável e com estímulo humoral e celular semelhante ao hidróxido de alumínio (LINCOPAN et al, 2009).

1.3.3.2- Antígenos de *Taenia solium* e *Taenia crassiceps*

Antígenos brutos de *T. solium* foram estudados previamente por diferentes autores para a utilização no diagnóstico da cisticercose humana e cisticercose suína, além, de estudos direcionados para o desenvolvimento de vacinas anti-cisticercose, porém, a dificuldade de obtenção dos parasitas presentes em suínos naturalmente infectados constitui um problema importante, praticamente inviabilizando a sua utilização (GONZALEZ et al., 2005; VAZ et al., 1997). Mesmo com estas dificuldades, antígenos brutos e purificados de *T. solium* ainda são utilizados para o desenvolvimento do diagnóstico imunológico e de vacinas para cisticercose (SCIUTTO et al., 1995; TOLEDO et al., 2001; TSANG; BRAND; BOYER, 1989), porém, a obtenção destes antígenos é considerada de baixa reprodutibilidade devido à freqüente ruptura dos cistos e conseqüente perda do líquido vesicular, além de ser um procedimento trabalhoso e de baixo rendimento.

Reatividade e imunidade cruzada entre *T. solium* e *T. crassiceps* foi reportada por diferentes autores (SCIUTTO et al., 1990; VAZ et al., 1997). As vantagens do uso dos antígenos heterólogos de *T. crassiceps* são relacionadas à obtenção de número ilimitado de cisticercos reproduzidos na cavidade peritoneal; praticidade, devido à utilização de animais de pequeno porte (camundongos); facilidade da extração antigênica a partir dos parasitas e a reprodutibilidade dos diferentes lotes de antígenos (BUENO et al., 2000; SCIUTTO et al., 2002).

Bueno et al. (2000), em estudo comparativo utilizando teste ELISA com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps* para o diagnóstico imunológico da cisticercose, salientou que os testes com antígenos de *T. crassiceps* apresentaram

maior sensibilidade e homogeneidade dos resultados em relação aos de *T. solium,* ao utilizar amostras de soro e líquido cefalorraquiano de pacientes com NC, sugerindo, desta forma, as vantagens da utilização dos antígenos de *T. crassiceps*.

Proteínas de 12, 13 a 19, 22, 25, 28, 30, 35, 39, 41, 47, 55, 62, 74, 109, 121 e 131kDa presentes em líquido vesicular de *T. crassiceps* apresentaram reatividade com amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com NC em Imunoblot para pesquisa de anticorpos IgG e foram consideradas específicas e confirmatórias para o diagnóstico laboratorial da doença (BUENO et al., 2000).

Farias (2006) apresentou a análise da antigenicidade de sete peptídeos sintéticos derivados de proteínas de baixo peso molecular de *T. crassiceps* e sua possível aplicação no diagnóstico da cisticercose. A utilização de “múltiplos peptídeos antigênicos” (MAP-a) foi considerada promissora, apresentando em teste ELISA com amostras de soros de pacientes com NC e de indivíduos supostamente saudáveis, sensibilidade e especificidade, respectivamente, de 92,3% e 90,4%.

Proteínas de 200 a 8kDa de *T. crassiceps* foram utilizadas como um modelo para o desenvolvimento de um protótipo vacinal para cisticercose suína. Das proteínas utilizadas, frações de 56, 66 e 74kDa apresentaram alto nível de proteção, sendo consideradas irrelevantes apenas as proteínas de 150 a 160, 93 e 108kDa (VALDEZ et al, 1994). De maneira semelhante, proteínas de *T. solium* foram utilizadas em ensaios vacinais para cisticercose murina (*T. crassiceps*) e os resultados também foram considerados promissores (SCIUTTO et al., 1990). Desta forma, pode-se considerar que as proteínas de *T. solium* e *T. crassiceps* possuem suficiente homologia para ensaios *in vitro*, assim como para imunoproteção na cisticercose murina e suína.

Espindola et al. (2005) demonstraram em teste ELISA com proteínas de 18 e 14kDa de *T. crassiceps,* resultados com alta sensibilidade e especificidade, dispensando até mesmo, o uso de testes confirmatórios, como o Imunoblot, no diagnóstico da cisticercose humana, podendo, desta maneira, ser um novo candidato para a utilização em ensaios para avaliação de vacinas.

Diversas técnicas foram utilizadas no desenvolvimento de vacinas anti-cisticercose, como o uso de antígenos brutos e purificados (SCIUTTO et al, 1995; VALDEZ et al, 1994), peptídeos sintéticos (HUERTA et al., 2001; TOLEDO et al., 1999) e antígenos recombinantes (FLISSER et al., 2004; LIGHTOWLERS, 2003; MANOUTCHARIAN et al., 2004; VALQUEZ-TALAVERA, 2001; WANG et al., 2003).

Baig et al. (2006) mesmo com as dificuldades relacionadas com a obtenção de antígenos de *T. solium*, induziram após a aplicação vacinal de cisteína protease de *T. solium*, cerca de 72,0% de proteção em camundongos.

Estudos avaliaram a imunidade cruzada entre cisticercose murina e suína em que extratos totais de cisticercos de *T. crassiceps* e *T. solium* apresentaram efetiva proteção (acima de 99,0%) contra cisticercose murina (SCIUTTO et al., 1990) e em adição, antígenos de *T. crassiceps* foram capazes de proteger parcialmente suínos desafiados com ovos de *T. solium* (acima de 58,0%) (SCIUTTO et al., 1995), porém, utilizando-se ACF. Estes resultados indicam que o modelo de cisticercose murina é adequado para avaliar antígenos de interesse para estudos prévios visando o desenvolvimento de vacinas para cisticercose suína (SCIUTTO et al., 1990).

Antígenos recombinantes podem induzir resposta imune protetora entre 85,0% a 100,0% após o desafio dos hospedeiros intermediários, sendo: antígenos recombinantes baseados em *T. ovis* (To45S, To16K e To45W), 87,0% a 94,0% de proteção em ovelhas; *T. saginata* (TSA-9, TSA-18), 99,0% de proteção em bovinos; *T.solium* (GST-cC1, 45W-4B, TSOL45 e TSOL18), 85,0% a 100% em suínos (LIGHTOWLERS, 2003; GONZALES et al, 2005; GUO et al, 2004; LUO et al, 2009). Paramiosina recombinante de *T. solium* pode induzir 52,0% de proteção em cisticercose murina (VALQUEZ-TALAVERA et al., 2001).

Vacinas gênicas estão sendo estudadas a fim de estimular o sistema imune para a proteção de diversas doenças. Uma das propostas deste perfil de imunização envolve a “auto-replicação”, em que vetores de RNA podem ser considerados mais imunogênicos do que a utilização de plasmídeos, quando camundongos foram imunizados por via intramuscular. Após a morte celular por apoptose, produzindo desta maneira, RNA intermediário e antígenos que podem estimular uma resposta pró-inflamatória, na tentativa de simular uma infecção viral nas células do hospedeiro (LEITNER, YING; RESTIFO, 2000).

Rosas et al. (1998) induziram após aplicação de vacinas gênicas baseadas em *T. crassiceps*, pcDNA3 e pTc-7, respectivamente, 33,0% e 58,0% de proteção na cisticercose murina. Outras vacinas baseadas em *T. crassiceps* também apresentaram resultados promissores: CPhV e pcDNA3, respectivamente, 86,0% e 65,0% de proteção em suínos (MANOUTCHARIAN et al, 2004; MANOUTCHARIAN et al, 1998). Paramiosina de *T. solium* (VW2-1) induziu entre 43,0% e 48,0% de proteção em suínos (SOLIS et al., 2005).

Peptídeos sintéticos também podem ser considerados como uma fonte alternativa para o desenvolvimento de vacinas. Os peptídeos, KETc1 e KETc12, baseados em *T. crassiceps* induziram, respectivamente, 67,0% e 73,0% de proteção para a cisticercose murina (TOLEDO et al., 2001). Outros autores apresentaram resultados animadores com a utilização dos peptídeos de forma isolada ou em *pool*. GK-1, peptídeo baseado em *T. crassiceps*, induziu entre 40,0% e 70,0% de proteção para a cisticercose murina, enquanto que a vacina S3Pvac, que contém os peptídeos GK1, KETc1 e KETc12, reduziu cerca de 50,0% o número de cisticercos em suínos já infectados e 98,0% de proteção em suínos posteriormente desafiados (ALUJA et al., 2005; HUERTA et al., 2001; TOLEDO et al., 1999).

1.4- Resposta imunoregulatória na cisticercose

A maioria das respostas imunológicas relacionada com infecções helmínticas apresenta um perfil Th2, com produção significativa de IL- 4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e consequentemente produção de imunoglobulina E, eosinófilos e mastócitos (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE, 2002), porém, nos casos de cisticercose experimental e NC, alguns autores registraram a presença de resposta imunoregulada com perfil misto Th1 e Th2 (RESTREPO et al., 2001; TOENJES; KUHN, 2003).

Toenjes e Kuhn (2003) demonstraram em culturas de células esplênicas obtidas de camundongos infectados com *T. crassiceps*, a indução de resposta Th2 com produção de IL-4, IL-6 e IL-10, além de diminuição da produção de IL-2 e IFN-γ. Este perfil foi mantido durante o desenvolvimento parasitário. Em contraste, camundongos com cisticercose crônica apresentaram resposta Th1 e Th2, com altos níveis de IL-4 e IL-10 presentes no soro e a produção de IL-4 e IFN-γ em culturas de células esplênicas. Assim, processos contínuos de ativação Th1 e Th2 aparentemente favorecem a reprodução progressiva e maciça dos parasitas presentes em infecções crônicas (TERRAZAS et al., 1998, 1999).

Evidências demonstram que a resposta imune dominada pela produção de citocinas Th2, como as IL-4 e IL-10, pode diminuir a severidade da resposta aguda e permitir a sobrevivência dos hospedeiros (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE,

2002), enquanto que a presença de resposta Th1 em suínos vacinados sugere um mecanismo que limita a estabilidade e multiplicação dos parasitas (DÍAZ et al., 2003). Estudos evidenciaram que antígenos helmínticos podem inibir a migração de células dendríticas e, portanto, diminuir a produção de IL-12. Desta maneira, o hospedeiro desvia a resposta imune para o perfil Th2 (MACDONALD; ARAUJO; PEARCE, 2002).

Bueno et al. (2004) relataram que as citocinas produzidas na fase inflamatória da NC possuem predomínio de resposta Th1, enquanto que pacientes em fase não inflamatória possuem uma alternância de resposta Th1 e Th2. A linfoproliferação em pacientes com NC em diferentes fases evolutivas da patologia pode variar dependendo do estímulo antigênico, sendo que antígenos de membrana e secreção de *T. solium* estimularam a proliferação celular (BUENO et al., 2001).

Os níveis de citocinas dependem da variabilidade da resposta imune induzida por diferentes antígenos, da diversidade genética do hospedeiro e da variação da exposição parasitária. Assim, a resposta imunoregulatória presente na cisticercose continua sendo foco para estudos, dependendo o perfil, portanto, da variabilidade do objeto de estudo (DÍAZ et al., 2003).

2- OBJETIVOS

Como contribuição ao controle do complexo teníase-cisticercose, o objetivo deste estudo foi a avaliação da resposta imune protetora humoral e celular no modelo experimental de cisticercose murina induzida por antígeno bruto e purificado de *T. crassiceps,* sugeridos com potencial uso em vacinas para cisticercose suína.

Sendo assim, os objetivos específicos são:

I- Análise da imunidade protetora induzida por antígeno bruto e purificado de *T. crassiceps* na cisticercose murina.

I.I- Avaliação da imunidade humoral por pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps*, análise da relação IgG1 e IgG2a e, do índice de avidez em grupos de animais submetidos a protocolos de imunização dose-resposta dependentes.

I.II- Avaliação da resposta imunoregulatória celular por análise da proliferação celular, dosagem de citocinas e teste de hipersensibilidade tardia.

II- Comparação de diferentes protocolos de imunização: variação do perfil de imunização (ativa ou passiva), via de imunização, adjuvantes, concentrações antigênicas, número de doses e períodos de desafio com cisticercos de *T. crassiceps*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Parasitas e antígenos

Os cisticercos de *T. crassiceps,* cepa ORF*,* foram mantidos em laboratório pela inoculação de 10 cisticercos jovens em peritônio de camundongos isogênicos Balb/c fêmeas, entre nove e 12 semanas de idade, segundo metodologia descrita por Vaz e colaboradores (1997) para a obtenção do antígeno bruto e purificado. A utilização e a manipulação animal foram aprovadas pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEUA/FCF/335), de acordo com o Comitê Brasileiro para Experimentação Animal (em anexo).

Foram utilizados dois extratos antigênicos, sendo um antígeno purificado: proteínas de 18 e 14kDa de *T. crassiceps* (**18/14**) (ESPINDOLA et al., 2005) e um antígeno bruto: antígeno total de cisticercos de *T. crassiceps* (**LV-total**) (BUENO et al., 2000).

O antígeno **LV-total** foi preparado segundo Bueno e colaboradores (2000) com algumas modificações. Após lavagens sucessivas com solução fisiológica, os cisticercos de *T. crassiceps* foram macerados em tubo tipo Falcon® (Corning® Inc., Inglaterra) com o auxílio de um bastão de vidro durante 20 minutos em macerador de vidro e sonicados a 20kHz, 1mA por quatro períodos de 40 segundos em banho de gelo. O sobrenadante, composto por constituintes de membrana e de líquido vesicular, obtido após a centrifugação a 10.000rpm por 30 minutos a 4°C foi recolhido. Inibidores de proteases foram adicionados e o extrato antigênico, intitulado assim como LV-total, fracionado e congelado a 4°C até o momento do uso.

3.1.1 - Análise dos extratos antigênicos

Primeiramente fez-se a dosagem de proteína segundo Lowry et al. (1951). Após este passo, os extratos foram submetidos à técnica de SDS-PAGE e

separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 15%, segundo Laemmli (1970). Os cálculos de mobilidade relativa e peso molecular foram calculados segundo Laemmli (1970).

3.2- PROTOCOLOS DE IMUNIZAÇÃO

Para a análise do perfil de proteção contra cisticercos de *T. crassiceps* foram utilizados diferentes protocolos de imunização. O estudo foi baseado na análise de 32 grupos experimentais divididos de acordo com os protocolos de imunização ativa subcutânea (19 grupos), protocolo de imunização ativa oral (seis grupos) e protocolo de imunização passiva (sete grupos).

Os protocolos utilizados variaram por perfil de imunização (ativa ou passiva); via de imunização (subcutânea, oral ou intraperitoneal); extrato antigênico (18/14 ou LV-total); concentração antigênica ou de anticorpos monoclonais (5 a 250µg), no caso da imunização passiva; número de doses (1 a 8), adjuvantes (DODAB, PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem adjuvante) e período de desafio com cisticercos de *T. crassiceps* (30 a 60 dias). A seguir estão as descrições referentes aos protocolos de imunização.

3.2.1- Protocolos de imunização ativa

Os protocolos de imunização ativa foram divididos de acordo com a via de imunização: subcutânea ou oral. Foram analisados 19 grupos experimentais subdivididos em três protocolos de imunização ativa subcutânea, além de seis grupos experimentais imunizados de acordo com o protocolo de imunização ativa oral.

3.2.2- Adjuvantes

Para os protocolos de imunização ativa subcutânea ou oral, o antígeno selecionado foi aplicado nos grupos experimentais com ou sem o auxílio de adjuvantes. Os adjuvantes considerados neste estudo foram: DODAD (LINCOPAN et al, 2009), representado por partículas de sílica ligadas com fragmentos catiônicos para a adsorção de proteínas, PSS/DDA (LINCOPAN et al., 2007), que consiste de partículas de poliestireno (cerca de 301nm) cationizadas ou hidróxido de alumínio ($Al(OH)_3$.

3.2.3- Protocolos de imunização ativa subcutânea

Foram analisados 19 grupos experimentais baseados em três protocolos de imunização ativa subcutânea: **Protocolo I-** Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias, **Protocolo II-** Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias e **Protocolo III-** Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.

Os grupos experimentais (cinco a dez camundongos Balb/c por grupo) foram imunizados pela via subcutânea com o antígeno 18/14 com ou sem o auxílio dos adjuvantes: DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$ e, desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* pela via intraperitoneal para cálculo do índice de proteção.

3.2.3.1- Protocolo I - Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias

A concentração antigênica utilizada para este protocolo foi de 10µg de 18/14, visto que para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps,* esta mesma concentração foi considerada eficiente para o estímulo de órgãos linfóides dos camundongos Balb/c (ESPINDOLA et al, 2005), adicionada também à dificuldade de purificação antigênica, método lento com baixo rendimento. Foram analisados três grupos experimentais imunizados com 10µg de 18/14, uma dose, e

auxílio dos adjuvantes PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou ainda, sem o auxílio de adjuvantes (tabela 2).

Tabela 2- Grupos experimentais pertencentes ao protocolo I de imunização ativa subcutânea com 10µg de 18/14, uma dose, com auxílio dos adjuvantes PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 60 dias.

Adjuvante	18/14 (dose)
	10µg
PSS/DDA	+
$Al(OH)_3$	+
Sem adjuvante	+

Legenda: (+) grupo experimental analisado de acordo com o protocolo I de imunização ativa subcutânea.

Os grupos foram avaliados de acordo com os parâmetros obtidos ao longo do tempo (T), em dias, de análise do protocolo I referentes à resposta imune humoral, resposta imune celular e índice de proteção (figura 2).

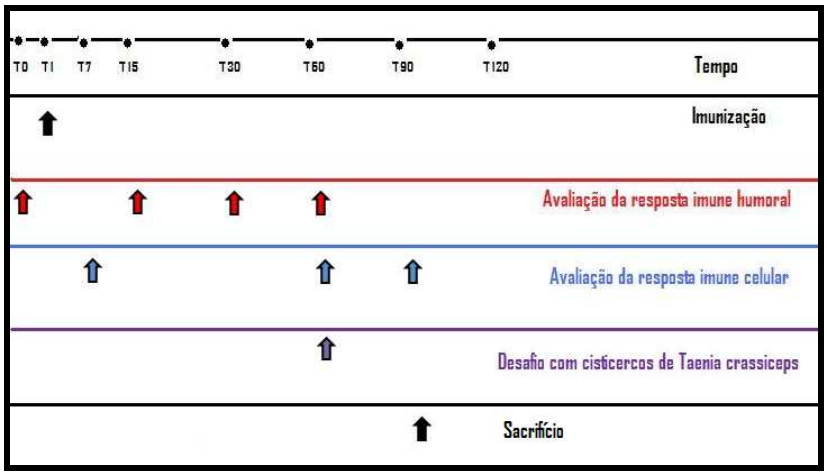


Figura 2- Parâmetros de análise referentes ao protocolo I de imunização ativa subcutânea.
Legenda: As setas indicam o momento, de acordo com o tempo, em dias, da imunização, das análises dos parâmetros relacionados com a avaliação da resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG, análise de avidez e relação IgG1/IgG2a), da resposta imune celular (teste de hipersensibilidade tardia e proliferação celular) e do índice de proteção (desafio com cisticercos de *T. crassiceps* e sacrifício dos camundongos para contagem dos cisticercos desenvolvidos).

A dose vacinal foi aplicada por via subcutânea no primeiro dia do experimento, considerado como T1. As amostras de soro dos camundongos foram coletadas antes da aplicação antigênica (T0), após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias contados a partir da dose vacinal para a avaliação da resposta imune humoral: pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA indireto e por Imunoblot (T15, T30 e T60), análise de avidez (T30 e T60) e relação IgG1 e IgG2a (T30 e T60).

No T7, T60 e T90 foram realizados procedimentos relacionados com a avaliação da resposta imune celular, sendo no T7 e T60 aplicado o teste de hipersensibilidade tardia e no T60 e T90 a cultura de células de linfonodos e baço para a análise de proliferação celular. Os grupos foram desafiados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* no T60 e sacrificados após 30 dias do desafio, no T90, para contagem dos cisticercos e análise do índice de proteção.

3.2.3.2- Protocolo II- Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias

A concentração antigênica utilizada para este protocolo de imunização foi de 5, 10 ou 20µg de 18/14 e auxílio dos adjuvantes DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. Foram analisados nove grupos experimentais, sendo três grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 com o auxílio de DODAB, três grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 com o auxílio de PSS/DDA e três grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$ (tabela 3).

Tabela 3- Grupos experimentais pertencentes ao protocolo II de imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20ug de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ e desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias.

Adjuvante	**18/14 (dose)**		
	5µg	**10µg**	**20µg**
DODAB	+	+	+
PSS/DDA	+	+	+
$Al(OH)_3$	+	+	+

Legenda: grupo experimental analisado (+) entre os grupos imunizados de acordo com o protocolo II de imunização ativa subcutânea.

Os grupos foram avaliados de acordo com os parâmetros obtidos ao longo do tempo (T), em dias, de análise do protocolo II referentes à resposta imune humoral, resposta imune celular e índice de proteção (figura 3).

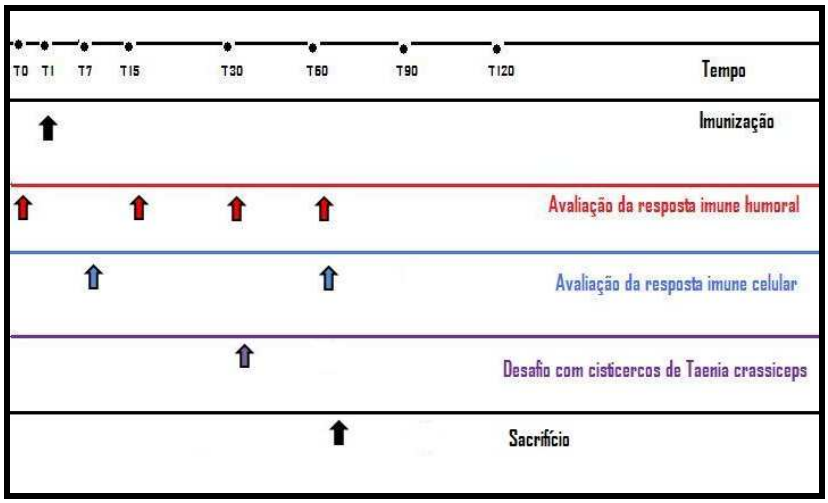


Figura 3- Parâmetros de análise referentes ao protocolo II de imunização ativa subcutânea.
Legenda: As setas indicam o momento, de acordo com o tempo, em dias, da imunização, das análises dos parâmetros relacionados com a avaliação de resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG, análise de avidez e relação IgG1/IgG2a), com a resposta imune celular (teste de hipersensibilidade tardia, proliferação celular e dosagem de citocinas) e índice de proteção (desafio com cisticercos de *T. crassiceps* e sacrifício dos camundongos para contagem dos cisticercos desenvolvidos).

A dose vacinal foi aplicada por via subcutânea no primeiro dia do experimento, considerado como T1. As amostras de soro dos camundongos foram coletadas antes da aplicação antigênica (T0), após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias contados a partir da dose vacinal para a análise da resposta imune humoral: pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA indireto e por Imunoblot (T15, T30 e T60), análise de avidez (T30 e T60) e relação IgG1 e IgG2a (T30 e T60).

No T7 e T60 foram realizados procedimentos relacionados com a avaliação da resposta imune celular, sendo no T7 e T60 aplicado o teste de hipersensibilidade tardia e no T60 a cultura de células de linfonodos e baço para a análise de proliferação celular e dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ. Os grupos foram desafiados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* no T30 e sacrificados após 30 dias do desafio, no T60, para contagem dos cisticercos e análise do índice de proteção.

3.2.3.3- Protocolo III- Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.

A concentração antigênica empregada para este protocolo foi de 20, 40 e 60µg de 18/14 e auxílio dos adjuvantes PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes. Foram analisados sete grupos experimentais, sendo um grupo imunizado com 20µg de 18/14, duas doses, com o auxílio de PSS/DDA; dois grupos imunizados com 20µg de 18/14, duas ou três doses, dois grupos imunizados com 40µg de 18/14, duas ou três doses e um grupo imunizado com 60µg de 18/14, três doses, totalizando cinco grupos com o auxílio de $Al(OH)_3$; e um grupo imunizado com 20µg de 18/14, duas doses, sem o auxílio de adjuvantes (tabela 4).

Tabela 4- Grupos experimentais pertencentes ao protocolo III de imunização ativa subcutânea com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose de imunização.

Adjuvante	Número de doses	18/14 (20µg)	18/14 (40µg)	18/14 (60µg)
PSS/DDA	2	+	Nc	Nc
$Al(OH)_3$	2	+	+	Nc
	3	+	+	+
Sem adjuvante	2	+	Nc	Nc

Legenda: grupo experimental analisado (+) ou que não consta (Nc) entre os grupos experimentais analisados de acordo com o protocolo III de imunização ativa subcutânea.

Os grupos foram avaliados de acordo com os parâmetros obtidos ao longo do tempo (T), em dias, de análise do protocolo III referentes à resposta imune humoral, resposta imune celular e índice de proteção (figura 4).

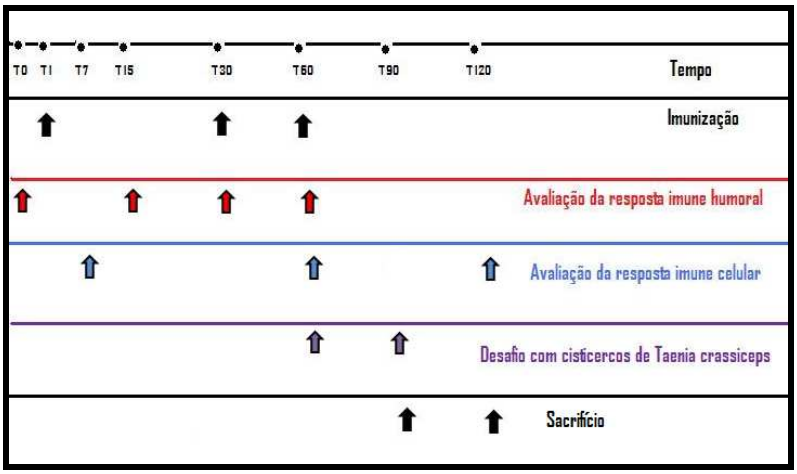


Figura 4- Parâmetros de análise referentes ao protocolo III de imunização ativa subcutânea.
Legenda: As setas indicam o momento, de acordo com o tempo, em dias, da imunização, das análises dos parâmetros relacionados com a avaliação da resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG, análise de avidez e relação IgG1/IgG2a), resposta imune celular (teste de hipersensibilidade tardia, proliferação celular e dosagem de citocinas) e índice de proteção (desafio com cisticercos de *T. crassiceps* e sacrifício dos camundongos para contagem dos cisticercos desenvolvidos).

A primeira dose vacinal foi aplicada por via subcutânea no primeiro dia do experimento, considerado como T1, a segunda dose no T30 e nos grupos que foram imunizados com a terceira dose, no T60. As amostras de soro dos camundongos foram coletadas antes da aplicação antigênica (T0), após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias contados a partir da primeira dose vacinal para a análise da resposta imune humoral: pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA indireto e por Imunoblot (T15, T30 e T60), análise de avidez (T30 e T60) e relação IgG1 e IgG2a (T30 e T60).

No T7, T60 e T120 foram realizados procedimentos relacionados com a avaliação da resposta imune celular, sendo no T7, T60 e T120 aplicado o teste de hipersensibilidade tardia e no T60 a cultura de células de linfonodos e baço para a análise de proliferação celular e dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ. Os grupos foram desafiados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias da última dose vacinal, T60 ou T90, e sacrificados após 30 dias a partir do desafio, T90 ou T120, para a contagem dos cisticercos e análise do índice de proteção.

3.2.4- Protocolo de imunização ativa oral

Foram analisados seis grupos experimentais, com cinco a dez camundongos por grupo, imunizados com 10, 20 ou 30µg do antígeno bruto LV-total ao invés do antígeno 18/14 por via oral. Em virtude da maior possibilidade de degradação proteica por esta via de administração optou-se por um antígeno com maior diversidade proteica. Foram aplicadas uma ou duas doses, com o auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ e os animais desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* para cálculo do índice de proteção (tabela 5).

Tabela 5- Grupos experimentais pertencentes ao protocolo de imunização ativa oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ e desafiados com cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose de imunização.

Adjuvante	Número de doses	LV-total (10µg)	LV-total (20µg)	LV-total (30µg)
$Al(OH)_3$	1	+	+	+
	2	+	+	+

Legenda: (+) grupos experimentais analisados

Os grupos foram avaliados de acordo com os parâmetros obtidos ao longo do tempo (T), em dias, de análise do protocolo de resposta imune ativa oral referente à resposta imune humoral e ao índice de proteção (figura 5).

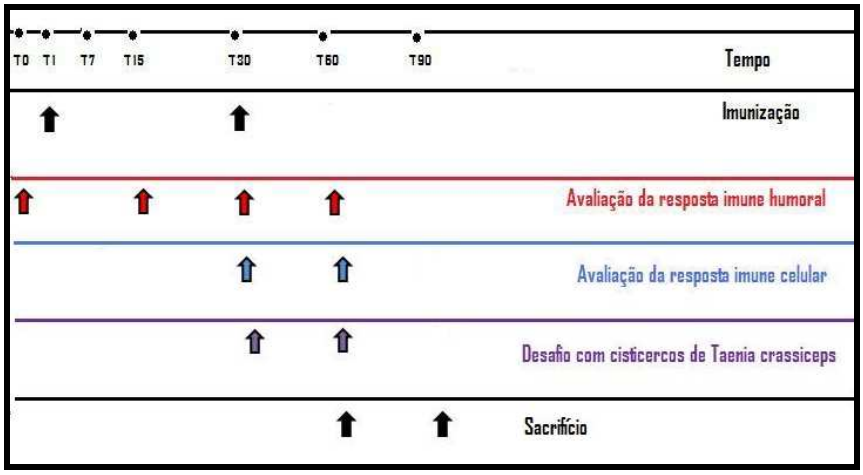


Figura 5- Parâmetros de análise referentes ao protocolo de imunização ativa oral.
Legenda: As setas indicam o momento, de acordo com o tempo, em dias, de imunização, das análises dos parâmetros relacionados com a avaliação da resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG, índice de avidez e relação IgG1/IgG2a), avaliação da resposta imune celular (teste de hipersensibilidade tardia) e índice de proteção (desafio com cisticercos de *T. crassiceps* e sacrifício dos camundongos para contagem dos cisticercos desenvolvidos).

A primeira dose vacinal foi aplicada por via oral no primeiro dia do experimento, considerado como T1, e após trinta dias, T30, para os grupos em que foi aplicada a segunda dose. As amostras de soro dos camundongos foram coletadas antes da aplicação antigênica (T0), após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias contados a partir da primeira dose vacinal para a análise da resposta imune humoral: pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA indireto e por Imunoblot (T15, T30 e T60), índice de avidez e relação IgG1 e IgG2a (T30 e T60).

Os grupos foram submetidos ao teste de hipersensibilidade tardia após 30 dias da última ou única imunização (T30 ou T60).

Os grupos foram desafiados com 10 cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias da única ou segunda dose vacinal (T30 ou T60) e sacrificados após 30 dias a partir do desafio (T60 ou T90) para contagem dos cisticercos e análise do índice de proteção.

3.2.5- Protocolo de imunização passiva

O teste de imunização passiva foi realizado de acordo com Buissa-Filho et al. (2008) com algumas modificações. Foram analisados sete grupos experimentais, com três camundongos Balb/c por grupo, sendo seis grupos imunizados com 50 a 250µg de anticorpos monoclonais (ESPINDOLA et al., 2002) anti-excreção e secreção de *T. crassiceps* (anti-ES-Tcra), que reconhecem em Imunoblot as proteínas de 14 e 18kDa de *T. crassiceps*, e grupo imunizado com 100µg de anticorpos monoclonais anti-microcistina, que não apresentam reatividade em Imunoblot com as proteínas de 14 e 18kDa de *T. crassiceps,* cedido gentilmente pela pós-doutoranda Fabyana Maria dos Anjos, Laboratório de Toxicologia, Professor Doutor Ernani Pinto, FCF/USP.

Em dois dos seis grupos previamente citados e imunizados com anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra, dez cisticercos, anteriormente bloqueados por duas horas com 50 ou 100µg de anti-ES-Tcra foram inoculados pela via intraperitoneal. Para estes grupos a imunização foi denominada de “bloqueio”. Nos demais cinco grupos do protocolo de imunização passiva, 10 cisticercos foram inoculados por via

intraperitoneal e os camundongos foram submetidos a oito doses intraperitoneais (a cada três ou quatro dias) de 50, 100 ou 200µg de anti-ES-Tcra ou uma dose de 250µg de anti-ES-Tcra ou oito doses (a cada três ou quatro dias) de 100µg de anti-microcistina. Para estes grupos a imunização foi denominada de passiva (Tabela 6).

Tabela 6- Grupos experimentais pertencentes ao protocolo de imunização passiva com 50 a 250µg de anticorpos monoclonais (AcMo) anti-ES-Tcra ou anti-microcistina.

Imunização	***Desafio (T. crassiceps)***	***AcMo (dose intraperitoneal)***	***Número de doses intraperitoneais***
Bloqueio	10 cisticercos bloqueados com 50µg de anti-ES-Tcra	---	---
Bloqueio	10 cisticercos bloqueados com 100µg de anti-ES-Tcra	---	---
Passiva	10 cisticercos	Anti-ESTcra (250µg)	1
Passiva	10 cisticercos	Anti-ESTcra (50µg)	8
Passiva	10 cisticercos	Anti-ESTcra (100µg)	8
Passiva	10 cisticercos	Anti-ESTcra (200µg)	8
Passiva	10 cisticercos	Anti-microcistina (100µg)	8

Legenda: (---) não aplicado para o grupo experimental, (anti-ES-Tcra): anti-excreção e secreção de *T. crassiceps*.

Os grupos foram avaliados de acordo com os parâmetros obtidos ao longo do tempo (T), em dias, de análise do protocolo de resposta imune passiva referentes à resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps*) e ao índice de proteção (figura 6).

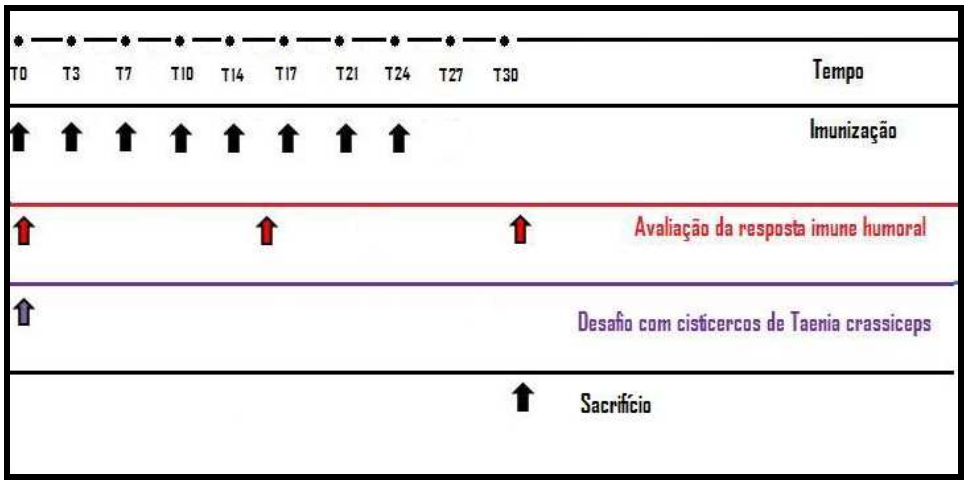


Figura 6- Parâmetros de análise referentes ao protocolo de imunização passiva.
Legenda: As setas indicam o momento, de acordo com o tempo, em dias, de imunização, das análises dos parâmetros relacionados com a avaliação da resposta imune humoral (pesquisa de anticorpos IgG) e do índice de proteção (desafio com cisticercos de *T. crassiceps* e sacrifício dos camundongos para contagem dos cisticercos desenvolvidos).

3.3- AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

A resposta imunológica estimulada dependendo das variáveis dos protocolos de imunização ativa e passiva foi analisada de acordo com os parâmetros de avaliação da resposta imune humoral e/ou celular. Os procedimentos utilizados para cada análise estão descritos a seguir.

3.3.1- Avaliação da resposta imune humoral

Para a avaliação da resposta imune humoral foram utilizadas amostras de soro de camundongos pertencentes aos grupos imunizados de acordo com os protocolos de imunização ativa e passiva. A coleta de sangue foi realizada por veia caudal, antes (T0) e após 15 (T15), 30 (T30) e/ou 60 (T60) dias contados a partir da primeira dose de imunização. As amostras de soro foram fracionadas e estocadas a -20ºC até o momento do uso.

A resposta imune humoral foi analisada com base nos resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos IgG por teste ELISA e Imunoblot, índice de avidez e análise da relação IgG1 e IgG2a.

3.3.1.1- ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps*

Inicialmente, o protocolo foi realizado segundo Espindola et al. (2005) com algumas modificações. Condições de sensibilização, tempo de incubação, bloqueio, diluição da amostra e utilização do cromógeno foram previamente avaliadas. Foi realizada a pesquisa de anticorpos IgG (total e subclasses IgG1 e IgG2a) anti-*T.crassiceps*.

As placas Costar® (Corning® Inc., Inglaterra) foram sensibilizadas com antígeno 18/14 (0,05µg/100µL), para a pesquisa de anticorpos IgG utilizando as amostras de soro dos grupos imunizados de forma ativa por via subcutânea ou de

forma passiva ou, sensibilizadas com LV-total (0,1µg/100µL), para a pesquisa de anticorpos IgG utilizando as amostras de soro dos grupos imunizados de forma ativa por via oral, em tampão carbonato/bicarbonato, 0,5M, pH 9,6, com uma quantidade suficiente para 100µL. A incubação foi realizada por 16 a 18h a 4ºC.

O bloqueio das placas foi realizado por uma hora com 200µL de solução de leite (Molico® desnatado, Nestlé, Suíça) a 5% em PBS (tampão fosfato salina, Na_2HPO_4 0,0075M, $Na_2H_2PO_4$ 0,025M e NaCl 0,14M) contendo 0,05% de Tween 20 (Merck®, Alemanha) (PBS-T). As etapas de bloqueio, adição da amostra de soro e adição do conjugado foram incubadas por uma hora a 37ºC.

Adicionaram-se 100µL das amostras de soro previamente diluídas 1:50 em leite 1%. Após esta etapa, foram adicionados 100µL de conjugado anti-camundongo-IgG-peroxidase (Sigma-Aldrich®, EUA) ou para os testes para pesquisa das subclasses específicas: conjugado anti-camundongo-IgG1-peroxidase ou anti-camundongo-IgG2a-peroxidase (SouthernBiotech®, EUA), em diluição previamente padronizada (respectivamente 1:3000, 1:2000 e 1:2000) em leite 1%. A solução cromogênica foi composta de Orto-Fenilenodiamina (Sigma-Aldrich®, EUA) (OPD) e H_2O_2, na proporção de 1mg de OPD, 1µL de H_2O_2 e 10mL de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e aplicada 100µL por poço. A incubação foi realizada por 10 minutos a 37ºC. A reação foi parada com 100µL de solução de ácido sulfúrico 4N.

Em todos os ensaios foram adicionados: *pool* de amostras de soro coletadas no T60 de camundongos previamente inoculados com *T. crassiceps* (controle positivo), *pool* de amostras de soros de camundongos coletadas no T0 (controle negativo) e branco de amostra (apenas diluente de amostra, leite 1%).

A cada etapa, as placas foram lavadas com PBS-T, exceto após a adição da solução cromogênica e parada da reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SLT Spectra®, SLT Labinstruments, SA-5082, Áustria) a 492nm. Os resultados para pesquisa de IgG foram apresentados por índice de reatividade e os resultados das subclasses de IgG por relação IgG1e IgG2a.

Índice de reatividade (IR) = Média (absorbância das amostras de soro de cada indivíduo do grupo analisado – branco de amostra) / (absorbância do controle negativo – branco de amostra).

Relação IgG1/IgG2a = [(Absorbância do *pool* de amostras de soro do grupo analisado para pesquisa de IgG1 – branco de amostra / absorbância do controle negativo – branco de amostra) / (Absorbância do *pool* de amostras de soro do grupo analisado para pesquisa de IgG2a – branco de amostra /absorbância do controle negativo – branco de amostra)].

3.3.1.2- Avaliação do índice de avidez

O índice de avidez foi calculado pela comparação das absorbâncias obtidas com *pool* das amostras de soro de cada grupo analisado em teste ELISA com LV-total (0,1µg/100µL) para pesquisa de anticorpos (protocolo sugerido no item 3.3.1.1), em que as etapas de lavagem foram realizadas com PBS-T, com as absorbâncias obtidas no teste ELISA em que após a incubação com *pool* das amostras de soro, a placa foi lavada com uréia 6M.

Considerou-se como positivo o índice de avidez igual ou acima de 60,0% (VAZ; TAKEI; BUENO, 2007).

Índice de avidez = [(absorbância do *pool* de amostras de soro do grupo analisado para pesquisa de IgG (uréia 6M) – branco de amostra) / (absorbância do *pool* de amostras de soro do grupo analisado para pesquisa de IgG (PBS-T) – branco de amostra)] x 100

3.3.1.3- Imunoblot

Após a transferência do antígeno LV-total para membrana de nitrocelulose (Millipore®, Alemanha), tiras de 3mm foram bloqueadas por duas horas com leite (Molico® desnatado, Nestlé, Suíça) a 5% diluído em PBS-T, com posterior incubação entre 15 e 18 horas a 4ºC com 700µL de *pool* de amostras de soro de cada grupo analisado diluídas 1:50 em leite 1%. O conjugado utilizado foi anti-camundongo-IgG-fosfatase alcalina (Bio-Rad®, Laboratories Inc., EUA), diluído 1:3000, em leite 1%,

incubado por uma hora, e a revelação foi feita com solução cromogênica contendo NBT/BCIP (nitro-azul de tetrazolium/5-bromo-4-cloro-3'-indol-fosfato), em tampão de revelação (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, $MgCl_2$ 50mM, pH 9,5). A reação foi parada com água destilada.

Condições de bloqueio, tempo de incubação, diluição da amostra, diluição do conjugado e utilização do cromógeno foram previamente avaliadas. Em todos os ensaios foram adicionados: *pool* de amostras de soro coletadas no T60 de camundongos previamente inoculados com *T. crassiceps* (controle positivo), *pool* de amostras de soro de camundongos coletadas no T0 (controle negativo) e branco de amostra (apenas diluente de amostra, leite 1%). Os resultados foram analisados de acordo com a presença ou ausência de reatividade das amostras de soro utilizadas com as proteínas (em kDa) presentes do antígeno LV-total.

3.3.2- Avaliação da resposta imune celular

A resposta imune celular foi avaliada de acordo com os resultados obtidos com o teste de hipersensibilidade tardia, proliferação de células obtidas de linfonodos e baço e dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ.

3.3.2.1- Teste de hipersensibilidade do tipo tardio (HTT)

No T7, T30, T60 e/ou T120 após a primeira ou única dose de imunização, os camundongos foram submetidos ao teste de HTT, de acordo com Katz, Kraaijeveld e Snippe (1994) utilizando 20µg de 18/14 ou LV-total (de acordo com o antígeno utilizado nas doses de imunização) em solução fisiológica estéril (volume final, 50µL), pela via subplantar (pata esquerda). Após 24 e 48 horas, o edema foi primeiramente medido com o auxílio de um pletismógrafo, porém, como não houve diferença entre as porcentagens quando obtidas entre as aferições com pletismógrafo ou paquímetro, a medida por paquímetro foi considerada como padrão, devido à facilidade de leitura. A medida subplantar da pata direita de cada

camundongo analisado foi considerada como controle negativo em relação ao edema proporcionado pelo teste.

Porcentagem de edema (HTT)= 100x [(edema apresentado na pata estimulada com o antígeno - edema apresentado na pata sem estímulo) / média de edema das patas sem estímulo].

3.3.2.2- Linfoproliferação

O ensaio de proliferação foi padronizado para verificação da atividade blástica dos linfócitos obtidos quando estimulados por antígenos específicos (18/14 e LV-total) ou mitógenos (fitohemaglutinina ou concanavalina - Sigma-Aldrich®, EUA), como controle positivo, e para a dosagem de citocinas produzidas e secretadas no sobrenadante da cultura celular. Os ensaios foram realizados de acordo com Manoutcharian et al. (2004), com algumas modificações.

No T60 ou T90, contados a partir da primeira ou única dose de imunização, foram coletadas células esplênicas e/ou de linfonodos poplíteos e inguinais removidas dos camundongos pertencentes a alguns grupos experimentais (de acordo com a viabilidade das células coletadas e quantidade disponível) e submetidas aos ensaios de proliferação celular e/ou dosagem de citocinas.

Cinco camundongos dos grupos experimentais selecionados foram sacrificados por excesso de barbitúricos, Pentobarbital, Hipnol®, 450mg/kg, e após a assepsia (pêlos e pele) com álcool 70%, o baço e/ou os linfonodos inguinais e poplíteos foram removidos e acondicionados em placa de Petri estéril contendo 5mL de meio RPMI® 1640 (Gibco®, Invitrogen, Austrália) e imediatamente utilizados nos ensaios de proliferação celular.

Baços e linfonodos coletados dos camundongos pertencentes aos grupos experimentais analisados foram macerados com o auxílio de um êmbolo de seringa em placa de Petri estéril contendo 5mL de meio RPMI, obtendo assim, um “lisado celular”. O lisado celular foi transferido para tubo de centrífuga tipo Falcon® (Corning® Inc., Inglaterra) estéril, graduado, de 50mL de capacidade, utilizando como auxílio, 5mL de meio RPMI para a lavagem da placa de Petri. Os restos

celulares foram removidos após sedimentação espontânea por 10 minutos à temperatura ambiente. Devido à grande quantidade de hemácias presentes no baço, este material foi tratado com solução de lise (cloreto de amônio 10% em água destilada estéril) para que houvesse o rompimento destas células, que poderiam interferir na proliferação blástica. Após três lavagens em meio RPMI a 1.700rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, as células foram ressuspendidas em 1mL de meio “RPMI completo” (meio de cultura RPMI acrescido de 10mM Hepes (Gibco®, Invitrogen, Austrália), 0,2% bicarbonato de sódio (Merck®, Alemanha), 100UI/mL de uma solução de penicilina e estreptomicina (Merck®, Alemanha), 2mM L-glutamina (Gibco®, Invitrogen, Austrália), 1% de mistura de aminoácidos não essenciais (Gibco®, Invitrogen, Austrália), 1mM de piruvato de sódio (Gibco®, Invitrogen, Austrália), β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®, EUA) 0,05 mM e 10% de soro bovino fetal (Gibco®, Invitrogen, Austrália), previamente inativado por 30 minutos a 56°C e avaliadas quanto à viabilidade celular.

Para a avaliação da viabilidade celular, as células mononucleadas obtidas dos linfonodos foram diluídas 1:10 (180µL de meio RPMI + 20µL de células mononucleares + 5µL de azul de Trypan 1:10) e as células obtidas do baço foram diluídas 1:40 (195µL de meio RPMI + 5µL de células mononucleares + 5µL de azul de Trypan 1:10) em meio RPMI e coradas em azul de Trypan (Gibco®, Invitrogen, Austrália) previamente 1:10, nas mesmas circunstâncias. A Avaliação foi realizada em câmara de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico.

A concentração celular foi estimada em câmara de Neubauer e ajustada para $1,25x10^6$/mL de meio RPMI completo em um volume final de 200µL ($2,5x10^5$/200µL). As células foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo chato (Corning® Inc., Inglaterra) na presença de do antígeno 18/14, LV-total ou mitógenos inespecíficos (Concanavalina A ou fitohemaglutinina), previamente esterilizados por filtração, em triplicatas, e mantidas a 37° C em 5% de CO_2 com atmosfera umidificada. Foram previamente determinados o período de incubação e a concentração dos estímulos específicos. Assim, foram utilizadas 20µg/mL dos extratos antigênicos e 20µg/mL dos mitógenos inespecíficos, como controle positivo. Para controle de *background* (branco) foi empregado meio RPMI completo, além de ser adicionado um controle contendo apenas as células sem estímulo antigênico (controle negativo). Após quatro dias de cultura, as células foram marcadas com Timidina triciada

(Amersham® Pharmacia Biothec, Inglaterra) na concentração de 1µCi/poço, incubadas por 16h e congeladas a -80ºC.

A leitura do ensaio de proliferação celular foi realizada após o descongelamento das placas. O material de cada placa foi fixado em fibra de vidro (Perkin Elmer®, EUA), seco a 56ºC por duas horas e a radioatividade emitida, medida por cintilação gasosa, com um auxílio do líquido de cintilação (Wallac®, Finlândia), em beta-cintilador (Betaplate®, Wallac, Finlândia) para posterior análise da proliferação celular.

Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm) e convertidos em índice de estimulação (IE), que foi obtido pela razão entre as leituras do teste com estímulo antigênico específico e do teste sem estímulo antigênico (controle negativo), obtidas do mesmo grupo analisado. O IE foi considerado positivo quando maior ou igual a 2,5 (BAIG et al, 2006).

3.3.2.3- Dosagem de citocinas

As dosagens de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN-γ) foram determinadas por teste ELISA (BDOptEIA®, BD Biosciences, EUA), quando utilizados os sobrenadantes de cultura celular ($1,0x10^6$/mL) estimulados por 24 ou 72 horas. Foram utilizados os sobrenadantes das culturas celulares estimulados com 20µg/mL de antígeno 18/14 ou LV-total de acordo com o protocolo de proliferação celular (item 3.3.2.2). Antes da dosagem, os sobrenadantes foram centrifugados a 200xg por 5 minutos, acondicionados em tubos para microcentrífuga e congelados a -80ºC até o momento do uso. A dosagem foi realizada dentro de um prazo de sete dias.

As concentrações de IL-4, IL-10 e IFN- γ presentes nos sobrenadantes analisados foram determinadas após a comparação das absorbâncias apresentadas por curva-padrão fornecida pelo teste ELISA.

3.4 – Índices de proteção

Os índices de proteção (IP) contra a cisticercose murina (induzida com 10 cisticercos de *T. crassiceps*) foram calculados para todos os grupos imunizados de forma ativa por via subcutânea e oral e de forma passiva por via intraperitoneal.

Para os grupos experimentais imunizados de forma ativa, os camundongos foram desafiados com 10 cisticercos de *T. crassiceps*, por inoculação intraperitoneal, após 30 ou 60 dias, contados a partir da aplicação da única ou última dose de imunização. No caso do protocolo de imunização passiva, o desafio ocorreu de forma semelhante ao protocolo de imunização ativa, porém, ocorreu no início do experimento, de acordo com as aplicações dos anticorpos monoclonais. Os camundongos foram sacrificados após 30 dias do desafio para contagem dos cisticercos. Grupos imunizados apenas com os adjuvantes utilizados e desafiados foram utilizados como controle para comparação do número de cisticercos de *T. crassiceps*.

O índice de proteção foi calculado pela seguinte equação:

Índice de proteção (IP) = 100 – [média (número de cisticercos coletados de cada indivíduo do grupo experimental/ média do número de cisticercos coletados do grupo controle, imunizado apenas com adjuvante, quando utilizado, e desafiado no mesmo período) x100]

3.5 – Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism® 5.0 (San Diego, California, USA). Os grupos de animais experimentais pertencentes aos protocolos de imunização ativa foram constituídos com cinco a dez camundongos por grupo e os dados provenientes destes grupos comparados através de análise de variância de uma ou duas vias (*one-way* ou *two-way* ANOVA), para os dados paramétricos, ou pelo teste de Kruskal-Wallis, para os dados não paramétricos, seguidos de pós-testes, t-Tukey, Dunns ou Bonferroni. Os resultados

foram considerados estatisticamente significativos quando o erro do tipo α mostrou valores menores de 5% ou $p<0,05$.

Ensaios em que foram utilizados *pool* de amostras de soro ou de células obtidas de órgãos linfóides de camundongos pertencentes aos grupos experimentais, como os ensaios de análise de avidez, relação IgG1 e IgG2a, proliferação de células e dosagem de citocinas, os testes estatísticos não foram utilizados e os dados obtidos comparados a critérios propostos no decorrer desta pesquisa. Da mesma forma foi considerada a análise dos dados obtidos com os grupos experimentais compostos por três camundongos, presentes no protocolo de imunização passiva, não havendo, desta maneira, análise estatística para comparação dos dados.

De acordo com as propostas de análises dos resultados, resumidamente, tem-se que: a análise de avidez foi considerada positiva quando os resultados foram apresentados acima de 60,0% (VAZ; TAKEI; BUENO, 2007). Para Relação IgG1 e IgG2a, resultados acima de 1,0 foram considerados com relação ao perfil de resposta imune Th2, enquanto que os resultados menores do que 1,0 com relação ao perfil de resposta Th1. Os ensaios de proliferação celular foram considerados positivos quando os IE foram igual ou acima de 2,5 (BAIG et al., 2006), enquanto que para a dosagem de citocinas, a análise foi realizada de forma conveniente aos grupos experimentais comparados, não havendo resultados positivos ou negativos.

4- RESULTADOS

4.1- Antígenos

A imunidade protetora contra cisticercose murina foi analisada utilizando antígeno purificado (18/14) e bruto (LV-total) de *T. crassiceps*. A cada nova obtenção dos extratos antigênicos utilizados, foi determinada a dosagem proteica, sendo em média 1.000µg/mL (18/14) e 3.200µg/mL (LV-total). O perfil eletroforético em SDS-PAGE a 15% está apresentado na figura 7.

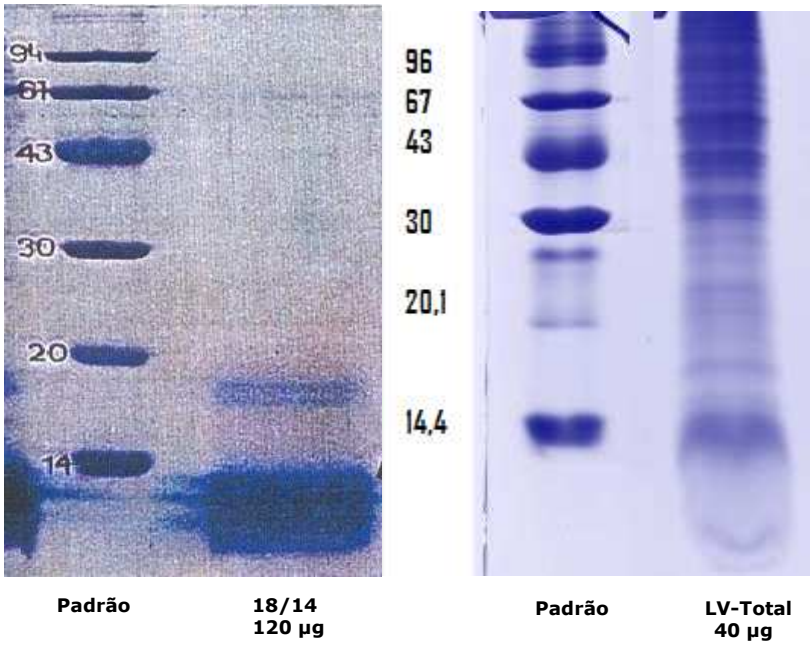


Figura 7 - SDS-PAGE a 15% com padrão de baixo peso molecular (padrão), antígeno 18/14 (120µg) e LV-total (40µg). Coloração realizada pelo método de Coomansie.

O perfil eletroforético dos antígenos utilizados apresenta proteínas apenas menores do que 18kDa, consideradas de baixo peso molecular (18/14) ou proteínas menores do que 14kDa a proteínas acima de 96kDa (LV-total).

Os resultados obtidos foram apresentados de acordo com os protocolos de imunização ativa (subcutânea e oral) ou protocolo de imunização passiva (intraperitoneal), avaliação da resposta imune humoral, avaliação da resposta imune celular e índice de proteção.

4.2- Protocolos de imunização ativa subcutânea

Os resultados estão apresentados de acordo com os dados obtidos com o Protocolo I- Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias, Protocolo II- Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias e Protocolo III- Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.

4.2.1- Protocolo I - Imunização com 10µg de 18/14 x desafio após 60 dias

A concentração antigênica utilizada para este protocolo foi de 10µg de 18/14. Para a obtenção de anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps,* esta mesma concentração antigênica foi considerada suficiente para o estímulo de camundongos Balb/c (ESPINDOLA et al, 2005). Adicionalmente à dificuldade de purificação antigênica e ao baixo rendimento do processo, esta concentração foi considerada pertinente para o início dos experimentos.

Os resultados obtidos com os três grupos imunizados com 10µg de 18/14 e diferentes esquemas de adjuvantes (PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvante) estão apresentados de acordo com cada avaliação de resposta imune e índices de proteção.

4.2.1.1- Avaliação da resposta imune humoral

A análise da resposta imune humoral dos grupos imunizados de acordo com o protocolo I foi baseada nos resultados apresentados com a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA e Imunoblot, relação IgG1 e IgG2a e, análise do índice de avidez.

A figura 8 apresenta os IR obtidos com a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* em teste ELISA com 18/14.

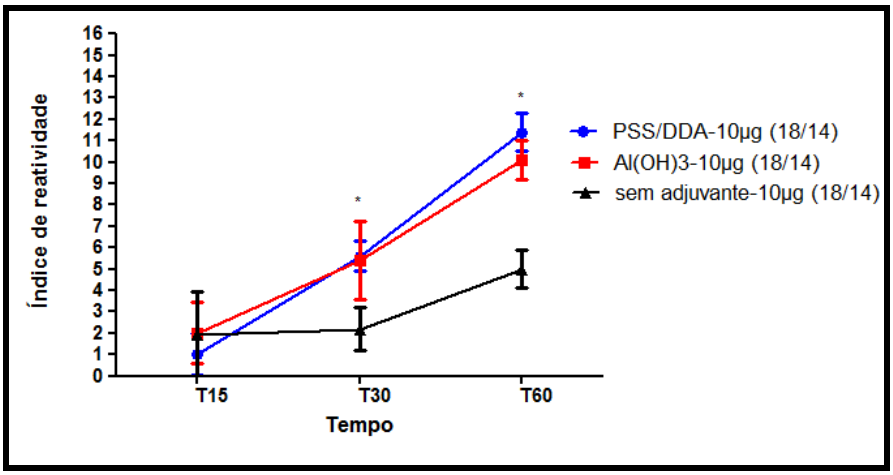


Figura 8- Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização ativa subcutânea com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante. Dados apresentados por médias ± desvio padrão (barras). Diferença significativa entre os grupos (*).

Os IR obtidos foram crescentes de acordo com a data de coleta (T15, T30 e T60) quando analisadas as amostras de soro de camundongos imunizados de acordo com o protocolo I (figura 8). No T15 não houve diferença significativa entre os IR obtidos (IR entre 1,0 e 2,0), enquanto que no T30 e T60, os grupos imunizados com PSS/DDA (IR= 5,6 e 11,4) ou $Al(OH)_3$ (IR= 5,4 e 10,1) apresentaram IR semelhantes, porém, superiores ($p<0,001$ no T30 e $p<0,0001$ no T60) aos do grupo imunizado sem o auxílio de adjuvantes (IR= 2,2 e 5,0).

A tabela 7 demonstra os índices de avidez e as relações IgG1e IgG2a com *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60.

Tabela 7- Índices de avidez e relações IgG1e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante.

Adjuvante	18/14 (dose)	IgG1/IgG2a T30	Avidez T30	IgG1/IgG2a T60	Avidez T60
PSS/DDA	10µg	1,1	62,5%	1,0	93,5%
$Al(OH)_3$	10µg	1,6	Negativo	1,3	90,4%
Sem adjuvante	10µg	1,0	Negativo	1,7	negativo

Legenda: Índice avidez menor do que 60% foi considerado negativo. Relação IgG1 e IgG2a acima de 1,0 (em vermelho) considerada como perfil de resposta imune Th2.

No T30, apenas o *pool* de amostras de soro do grupo imunizado com PSS/DDA apresentou índice de avidez positivo, quando comparado aos grupos imunizados

com o auxílio de $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes. No T60, os grupos imunizados com o auxílio de adjuvantes apresentaram índices de avidez maiores do que 90,0%, enquanto que o grupo imunizado sem o auxílio de adjuvantes permaneceu com índice de avidez negativo (tabela 7).

No T30 e T60 as relações IgG1 e IgG2a foram apresentadas iguais ou acima de 1,0, consideradas assim, com perfil Th2. Não houve variação de reatividade de acordo com os adjuvantes utilizados (tabela 7).

Os *pool* das amostras de soro coletadas no T15, T30 e T60 obtidas dos camundongos pertencentes aos três grupos relacionados com o protocolo I foram submetidos ao teste de Imunoblot com LV-total e o perfil de reatividade está apresentado na tabela 8.

Tabela 8- Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias.

Adjuvante	18/14 (dose)	T15 (kDa)	T30 (kDa)	T60 (kDa)
PSS/DDA	10µg	14,18,30	14,18,30	14,18,30
$Al(OH)_3$	10µg	14,18,30	14,18,30	14,18,30
Sem adjuvante	10µg	14,18	14,18,30	14,18,30

Os *pool* das amostras de soro (T15, T30 e T60) coletadas dos três grupos imunizados apresentaram reatividade em Imunoblot com LV-total e reconheceram as proteínas de 14, 18 e 30kDa, exceto o *pool* coletado no T15 do grupo imunizado sem o auxílio de adjuvante, o qual reconheceu apenas as proteínas de 14 e 18kDa. Não houve variação de reatividade entre os adjuvantes utilizados.

4.2.1.2- Avaliação da resposta imune celular

Para o protocolo I a avaliação da resposta imune celular foi baseada nos resultados obtidos com a proliferação celular e com o HTT.

Para os ensaios de proliferação celular foram utilizadas as células coletadas dos linfonodos poplíteos e inguinais e do baço no T60 (grupos imunizados) e T90

(grupos imunizados e desafiados) estimuladas com 20µg/mL de 18/14 ou LV-total. Os resultados estão demonstrados na tabela 9.

Tabela 9- Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de 18/14 ou LV-total obtidas dos grupos imunizados com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante.

Adjuvante	**18/14 (dose)**	**T60**				**T90**			
		18/14 (20µg/mL)		**LV-total (20µg/mL)**		**18/14 (20µg/mL)**		**LV-total (20µg/mL)**	
		Ly	Baço	Ly	Baço	Ly	Baço	Ly	Baço
PSS/DDA	10µg	2,72	1,63	0,01	0,01	**2,64**	**0,92**	**0,22**	**0,46**
$Al(OH)_3$	10µg	2,72	1,24	0,02	0,01	**3,99**	**0,74**	**0,18**	**0,46**
Sem adjuvante	10µg	5,62	1,90	0,25	0,04	**5,76**	**1,54**	**0,34**	**6,21**

Legenda: T60 amostras de células de linfonodos e esplênicas de grupos apenas imunizados, enquanto que no T90, de grupos imunizados e desafiados (valores em negrito). Em vermelho (valores considerados positivos de acordo com BAIG *et al*, 2006).

As células obtidas de linfonodos dos três grupos analisados apresentaram IE positivos quando estimuladas com 18/14 no T60 e T90, porém, não apresentaram reatividade com LV-total sob as mesmas condições. As células esplênicas não proliferaram quando estimuladas com 18/14 ou LV-total, exceto as células esplênicas obtidas do grupo imunizado com 10µg de 18/14 sem o auxílio de adjuvantes estimuladas com LV-total no T90 (tabela 9).

Quanto ao HTT, os grupos foram desafiados com 20µg de 18/14 por via subplantar no T7 e T60. A figura 9 representa os resultados obtidos.

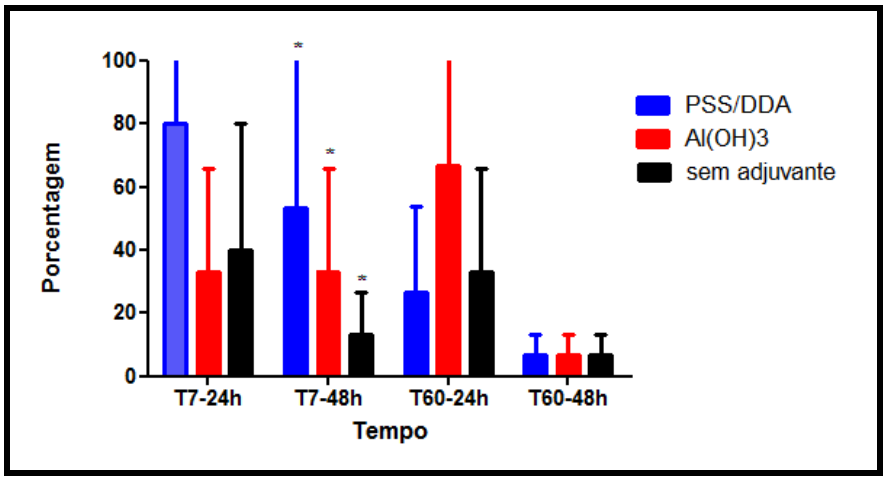


Figura 9 – Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete (T7) e sessenta (T60) dias contados a partir da imunização com 10µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante. As leituras foram realizadas após 24h e 48h. Dados apresentados por média ± desvio padrão (traço). Diferença significativa entre os dados obtidos dos grupos analisados (*).

No T7 - 24 e 48 horas, apenas o grupo imunizado com o auxílio de PSS/DDA apresentou média de HTT maior do que 40,0% (figura 9). De acordo com as análises estatísticas, no T7 - 24 horas, o grupo imunizado com PSS/DDA apresentou HTT mais expressivo do que quando comparado ao grupo imunizado com o $Al(OH)_3$ ($p<0,005$), porém, não houve diferença entre os grupos imunizados com adjuvantes ou sem o auxílio destes. No T7 - 48 horas, os grupos apresentaram diferentes HTT ($p<0,0001$), sendo o estímulo maior com PSS/DDA e sequencialmente com $Al(OH)_3$ e sem adjuvante, porém, apenas o grupo imunizado com PSS/DDA apresentou HTT maior do que 40,0% .

No T60 - 24h, apenas o grupo imunizado com $Al(OH)_3$ apresentou HTT maior do que 40,0%, havendo diferença ($p<0,002$) entre o grupo imunizado com o auxílio de $Al(OH)_3$ e PSS/DDA, porém sem diferença entre os grupos imunizados com adjuvantes ou sem o auxílio destes. Após 48h todos os grupos apresentaram HTT menores do que 10,0% (figura 9).

4.2.1.3- Índices de proteção

Os três grupos imunizados de acordo com o protocolo I foram desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps* no T60. Os resultados dos IP estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10- Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 10µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafio com dez cisticercos de *Taenia crassiceps* após 60 dias da dose vacinal.

Adjuvante	18/14 (dose)	Índice de proteção Média (±desvio padrão)
PSS/DDA	10µg	24,9% (±36,4)
$Al(OH)_3$	10µg	38,2%* (±43,8)
Sem adjuvante	10µg	51,8% (±34,5)

Legenda: (*): índice de proteção com presença de um camundongo com 100,0% de proteção (ausência total de cisticercos).

Os IP variaram entre 51,8% e 24,9%. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos analisados (tabela 10).

4.2.2- Protocolo II- Avaliação dose resposta x desafio após 30 dias

De acordo com os resultados dos IP obtidos com o protocolo I, a concentração antigênica anteriormente sugerida (10µg de 18/14), foi considerada não efetiva para a proteção dos grupos analisados. Sendo assim, para o protocolo II foram avaliadas três concentrações antigênicas com o auxílio de três diferentes adjuvantes e após, desafio com cisticercos de *T. crassiceps* em um esquema curto, trinta dias.

Os resultados foram obtidos com os nove grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes esquemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$.

4.2.2.1 – Avaliação da resposta imune humoral

A análise da resposta imune humoral dos grupos imunizados de acordo com o protocolo II foi baseada nos resultados obtidos com a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA e Imunoblot, relação IgG1 e IgG2a e, análise do índice de avidez.

A figura 10 apresenta os IR obtidos com a pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* em teste ELISA com 18/14.

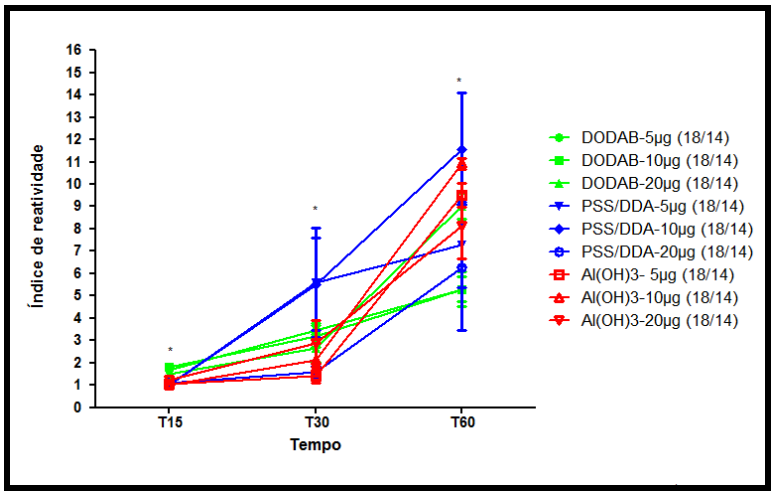


Figura 10- Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps* utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$. Dados apresentados das médias ± desvio padrão (barras). Dados entre os grupos com diferença significativa (*).

Todos os grupos analisados apresentaram valores crescentes dos IR de acordo com o tempo (T15, T30 e T60) de coleta das amostras (figura 10). Os grupos imunizados com 5 a 20µg de 18/14 apresentaram no T15 IR menores do que 1,8. Houve diferença significativa ($p<0,0001$) no T15 entre os adjuvantes utilizados, porém, não houve diferença entre as concentrações antigênicas. Os maiores índices foram obtidos com os grupos imunizados com o auxílio do adjuvante DODAB (IR=1,5 a 1,8), enquanto que os grupos imunizados com PSS/DDA (IR=1,0 a 1,1) ou $Al(OH)_3$ (IR= 1,0 a 1,3) não apresentaram diferença.

No T30, os IR obtidos dos grupos imunizados com 5 a 20µg de 18/14 com o auxílio de DODAB variaram entre 2,6 e 3,4, com PSS/DDA entre 1,2 e 1,6 e com

$Al(OH)_3$ entre 1,4 e 2,9 (figura 10). Os índices variaram ($p<0,0001$) de forma decrescente, sequencialmente com PSS/DDA, DODAB e $Al(OH)_3$. Esta variação entre os adjuvantes foi evidente quando utilizado 5µg de 18/14 como dose vacinal ($p<0,05$ a $p<0,0001$). Quando utilizado 10µg de 18/14 esta diferença não foi observada entre todos os adjuvantes e com 20µg de 18/14 não houve diferença entre os adjuvantes utilizados ($p>0,05$).

No T60, os IR foram apresentados maiores do que 3,4, sendo os grupos imunizados com 5 a 20µg de 18/14 com DODAB entre 5,3 e 8,9, com PSS/DDA entre 3,4 e 6,3 e com $Al(OH)_3$ entre 8,1 e 10,9. Os índices variaram ($p<0,001$) de forma decrescente com os grupos imunizados com PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ e, DODAB. Esta diferença foi significativa ($p<0,001$) quando analisados os grupos imunizados com 10µg de 18/14. Nas demais concentrações estas diferenças não foram expressivas (figura 10).

Os índices de avidez e as relações IgG1 e IgG2a foram obtidos inicialmente por teste ELISA utilizando *pool* das amostras de soro dos camundongos imunizados de acordo com o protocolo II coletadas no T30 e T60. Os resultados estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11- Índices de avidez e relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* das amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$.

Adjuvante	**18/14 (dose)**	**IgG1/IgG2a**	**Avidez**	**IgG1/IgG2a**	**Avidez**
		T30	**T30**	**T60**	**T60**
DODAB	5µg	2,3	100,0%	0,9	100,0%
	10µg	1,7	89,9%	0,8	100,0%
	20µg	2,4	100,0%	0,5	100,0%
Média (5 a 20µg)		2,1	100,0%	0,7	100,0%
PSS/DDA	5µg	2,0	66,0%	2,0	71,0%
	10µg	1,1	62,5%	0,9	93,5%
	20µg	1,3	65,7%	0,6	100,0%
Média (5 a 20µg)		1,5	65,0%	1,2	90,0%
$Al(OH)_3$	5µg	1,2	60,0%	0,5	61,0%
	10µg	1,3	100,0%	0,5	100,0%
	20µg	1,3	74,8%	0,6	100,0%
Média (5 a 20µg)		1,3	80,0%	0,5	90,0%

Legenda: Relação IgG1 e IgG2a acima de 1,0 (vermelho), grupos que apresentaram acima dde 90,0% de índice de proteção concomitantemente com os valores de relação de IgG1 e IgG2a acima de 1,0 no T30 e abaixo de 1,0 no T60 (sublinhado).

Todos os grupos apresentaram índices de avidez maior do que 60,0% no T30 e no T60. De acordo com as médias apresentadas entre os valores dos índices de

avidez obtidos com 5 a 20µg de 18/14, os grupos imunizados com DODAB apresentam maiores índices quando comparado aos demais adjuvantes. No T30, todas as relações IgG1 e IgG2a foram acima que 1,0. No T60, as relações IgG1 e IgG2a foram apresentadas menores do que 1,0, exceto com o grupo imunizado com 5µg de 18/14 e PSS/DDA que apresentou relação IgG1 e IgG2a de 2,0. Todos os grupos que apresentaram IP maiores do que 90,0% evidenciaram relação IgG1 e IgG2a no T30 e T60, respectivamente, acima de 1,0 e abaixo de 1,0, representando perfil seqüencial Th2 e Th1 (tabela 11).

Na tabela 12 estão apresentadas as reatividades em Imunoblot utilizando *pool* das amostras de soro coletadas no T15, T30 e T60 dos camundongos pertencentes aos nove grupos submetidos ao protocolo II de imunização.

Tabela 12- Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias.

Adjuvante	18/14 (µg)	T15 (kDa)	T30 (kDa)	T60 (kDa)
DODAB	5µg	14	14, 18, 30	14, 18, 30
	10µg	14	14, 18, 30	14, 18, 30, >40
	20µg	14	14, 18	14, 18
PSS/DDA	5µg	14	14, 18	14, 18, 30
	10µg	14	14, 18	14, 18, 30
	20µg	14	14, 18	14, 18, 30, >40
$Al(OH)_3$	5µg	14	14, 18	Nc
	10µg	14	14, 18	Nc
	20µg	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30

Legenda: (Nc) não consta resultado com esta amostra.

Os *pool* coletados no T15, T30 e T60 apresentaram reatividade em Imunoblot, reconhecendo, pelo menos, a proteína de 14kDa. A proteína de 18kDa foi reconhecida por todos os *pool* coletados no T30 e T60. No T60, todas as amostras reconheceram as proteínas de 14, 18e 30kDa, exceto do *pool* de amostras do grupo imunizado com 20µg de 18/14 e DODAB. Duas amostras reconhecerem as proteínas acima de 40kDa, pertencentes aos grupos imunizados com 10µg de 18/14 e PSS/DDA e imunizados com 20µg de 18/14 e PSS/DDA (tabela 12).

4.2.2.2- Avaliação da resposta imune celular

Para avaliação da resposta imune celular foram analisadas: a proliferação celular, a dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ, além do HTT.

Para os ensaios de proliferação celular foram utilizadas as células coletadas dos linfonodos poplíteos e inguinais e do baço no T60 (grupos imunizados e desafiados). As células foram estimuladas com 20µg de 18/14 ou LV-total. Os resultados dos IE estão na tabela 13.

Tabela 13- Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de 18/14 ou LV-total obtidas dos grupos imunizados com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$.

Adjuvante	**18/14 (dose)**	**T60**			
		18/14 (20µg/mL)		**LV-total (20µg/mL)**	
		Ly	Baço	Ly	Baço
DODAB	5µg	**2,91**	**1,45**	**0,49**	**0,95**
	10µg	**7,44**	**5,06**	**4,82**	**1,59**
	20µg	**0,75**	**2,60**	**0,07**	**2,22**
PSS/DDA	5µg	**6,00**	**1,70**	**3,08**	**5,36**
	10µg	**2,72**	**1,63**	**2,64**	**0,92**
	20µg	Nc	Nc	Nc	Nc
$Al(OH)_3$	5µg	**0,57**	**3,52**	**0,63**	**2,34**
	10µg	**6,56**	**6,42**	**4,04**	**3,08**
	20µg	Nc	Nc	Nc	Nc

Legenda: Valores considerados positivos de acordo com BAIG *et al*, 2006 (vermelho), grupos imunizados e desafiados (negrito) e resultado que não consta com esta amostra (Nc).

Todos os grupos que apresentaram proliferação das células obtidas de linfonodos quando estimuladas com LV-total, apresentaram IE superiores quando estimuladas com 18/14 (tabela 13).

Dois grupos apresentaram IE positivos quando utilizadas as células obtidas do baço estimuladas com LV-total, porém, um dos grupos (5µg de 18/14 e PSS/DDA) apresentou IE negativo quando as células foram estimuladas com 18/14. Dos grupos que apresentaram proliferação das células obtidas do baço quando estimuladas com 18/14, apenas um grupo apresentou IE positivo com LV-total, ainda sendo inferior ao resultado obtido com 18/14 (tabela 13).

A figura 11 esboça os resultados referentes à dosagem de IL-4, IL-10 e IFN-γ obtidos em cultura de células de linfonodos ou baço do grupo imunizado com 20µg de 18/14 com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ estimuladas com 18/14 ou LV-total. Devido à ausência de células suficientes para este experimento, não foram obtidos resultados com os demais grupos imunizados de acordo com o protocolo II.

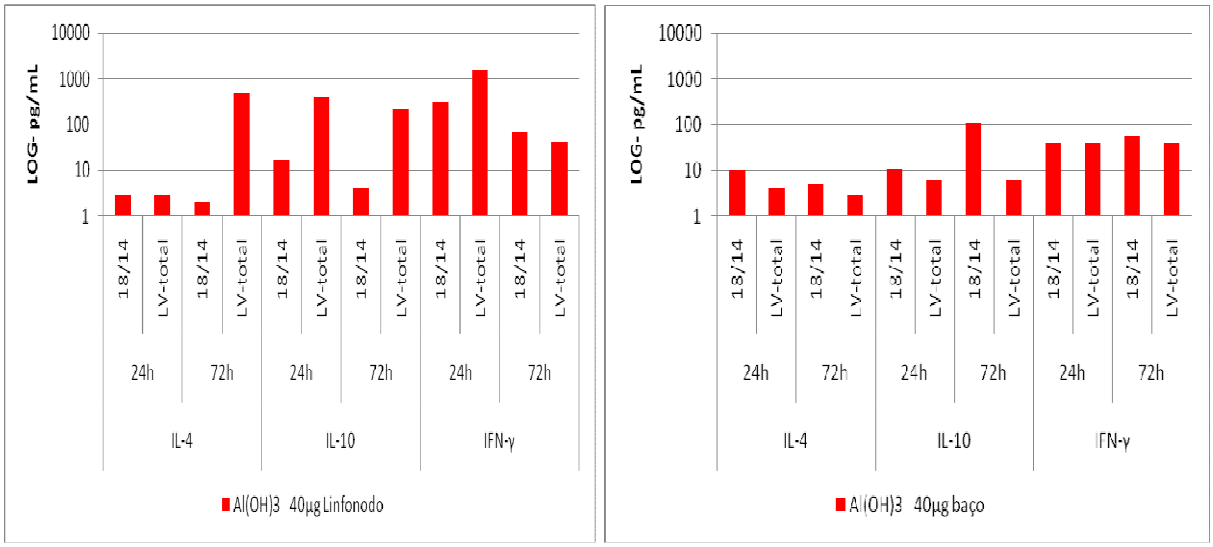


Figura 11 – Dosagem de IL-4, IL-10 e IFN-γ em sobrenadantes de cultura das células obtidas de linfonodos (ly) ou de baço (bç) referentes ao grupo imunizado com 20µg de 18/14 com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ e desafiado (T60), estimulados com antígeno 18/14 ou LV-total por 24h ou 72h.

Os sobrenadantes das culturas de células obtidas de linfonodos após 24 horas apresentaram valores superiores a 10pg/mL de IL-4 e de IL-10 e superiores a 100pg/mL de IFN-γ, quando estimuladas com 18/14 ou LV-total. Após 72 horas os sobrenadantes apresentaram valores superiores a 100pg/mL de IL-4 e IL-10 quando estimuladas com LV-total e abaixo de 10pg/mL quando estimuladas com 18/14. As culturas estimuladas com 18/14 ou LV-total apresentaram dosagens de IFN-γ menores que 100pg/mL (figura 11).

Os sobrenadantes das culturas de células esplênicas após 24 e 72 horas apresentaram concentrações menores do que 100pg/mL de IL-4, IL-10 ou IFN-γ quando estimulados com 18/14 ou LV-total (figura 11).

Na figura 12 estão os dados obtidos do HTT com os grupos imunizados de acordo com o protocolo II.

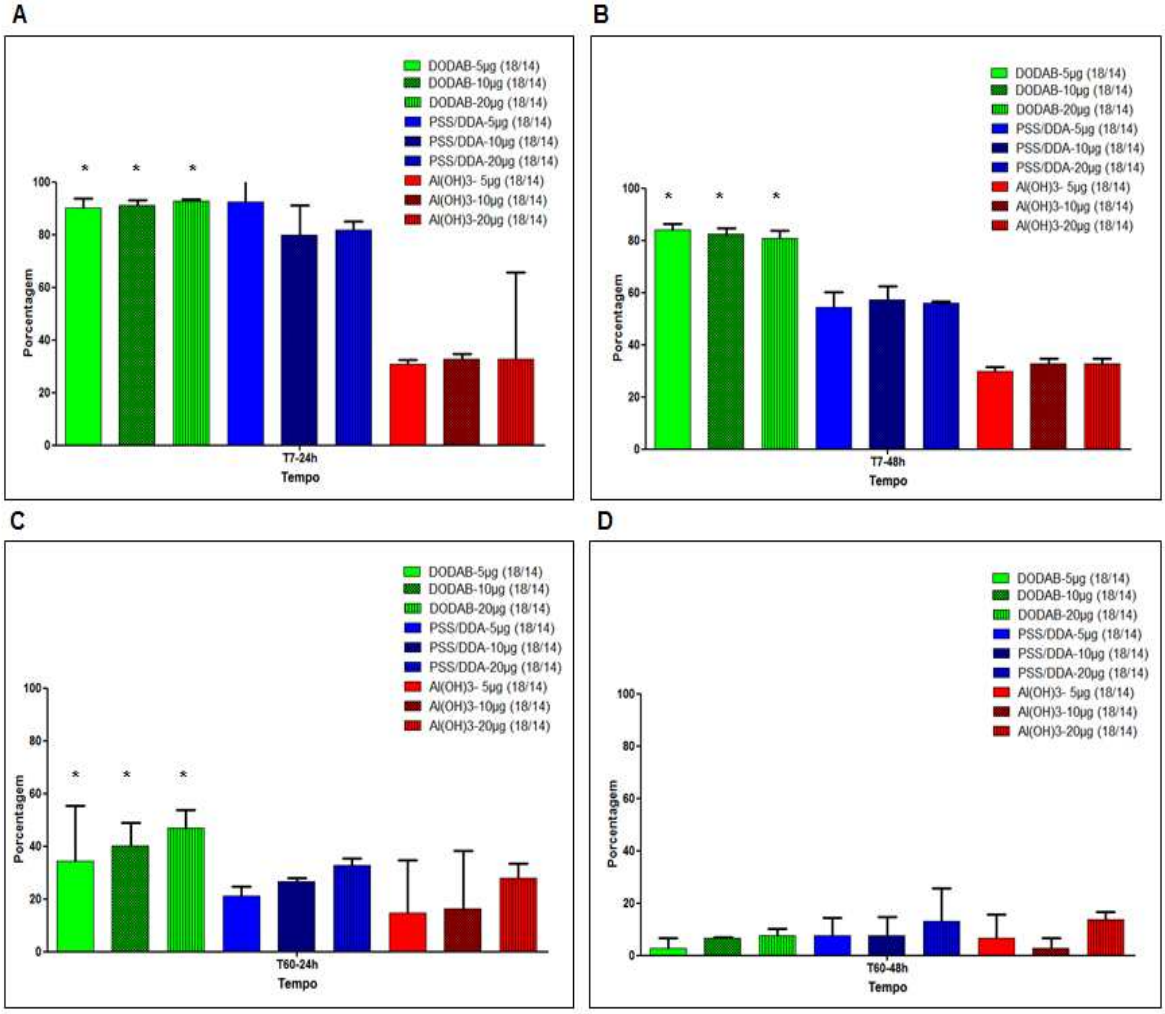


Figura 12 – Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete dias (T7) com leitura após 24h (A) e 48h (B) e sessenta (T60) dias com leitura após 24h (C) e 48h (D) contados a partir da imunização com 5, 10 ou 20µg de18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. Dados apresentados das médias ± desvio padrão (traço). Dados entre os grupos com diferença significativa (*).

De acordo com os dados apresentados na figura 12A e 12B, no T7 - 24 ou 48 horas, os grupos imunizados com o auxílio de DODAB ou PSS/DDA apresentaram HTT maiores do que 40,0%, enquanto que os grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$ apresentaram HTT menores do que 40,0%. Houve diferença entre os adjuvantes utilizados ($p<0,0001$), sendo os índices apresentados de forma decrescente entre DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$, mas, sem diferença entre as concentrações antigênicas ($p>0,05$).

No T60 – 24 horas (figura 12C), os grupos imunizados com o auxílio de DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ apresentaram HTT menores do que 40,0% após 24h, exceto com o grupo imunizado com 20µg de 18/14 com o auxílio de DODAB. Houve

diferença entre os adjuvantes utilizados ($p<0,003$), sendo os índices apresentados de forma decrescente entre DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$, mas, sem diferença entre as concentrações antigênicas. Após 48h todos os grupos apresentaram HTT menores do que 20,0% e sem diferença estatística ($p>0,05$) (figura 12D).

4.2.2.3- Índices de proteção

Todos os grupos analisados apresentaram IP acima de 60,0%. Os grupos imunizados com o auxílio de DOBAB apresentaram IP acima de 90,0%, enquanto que os grupos imunizados com PSS/DDA e $Al(OH)_3$ apresentaram IP, respectivamente, acima de 63,0% e acima de 60,0% (tabela 14).

Tabela 14- Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 5, 10 ou 20µg de 18/14 em diferentes sistemas de adjuvantes: DODAB, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ e desafio com dez cisticercos de *T. crassiceps* após 30 dias.

Adjuvante	**Camundongo**	**Índice de proteção**		
		5µg (18/14)	**10µg (18/14)**	**20µg (18/14)**
DODAB	1	100,0	100,0	96,5
	2	100,0	100,0	100,0
	3	100,0	100,0	83,3
	4	100,0	100,0	81,3
	5	98,4	100,0	90,3
	Média	**99,7%***	**100,0%***	**90,3%**
	Desvio padrão	**0,7**	**0,0**	**8,1**
PSS/DDA	1	67,8	71,1	52,8
	2	35,0	99,2	59,3
	3	79,0	54,6	74,0
	4	90,0	68,0	68,5
	5	52,0	57,0	63,6
	Média	**65,0%***	**70,1%***	**63,6%**
	Desvio padrão	**21,7**	**17,8**	**5,6**
$Al(OH)_3$	1	100,0	100,0	65,3
	2	100,0	100,0	70,8
	3	100,0	100,0	68,0
	4	100,0	100,0	68,0
	5	100,0	100,0	70,8
	Média	**100,0%***	**100,0%***	**68,0%**
	Desvio padrão	**0,0**	**0,0**	**2,3**

Legenda: Diferença estatística entre os IP obtidos com às demais concentrações com o mesmo adjuvante (*).

De acordo com os dados de proteção apresentados, sugere-se que as concentrações antigênicas 5 e 10µg apresentaram IP superiores quando comparado à 20µg utilizada com os diferentes adjuvantes (tabela 14).

4.2.3- Protocolo III- Avaliação dose resposta e número de doses X desafio após 30 dias.

Para a análise deste protocolo foram utilizados sete grupos imunizados com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, com duas ou três doses, em diferentes esquemas de adjuvantes (PSS/DDA e $Al(OH)_3$ ou sem adjuvantes). Foram propostas concentrações iguais ou acima de 20µg de 18/14, visto que no protocolo II não foram demonstrados IP de 100,0% utilizando $Al(OH)_3$, adjuvante comum, com uma dose com esta concentração, representando que seria necessário maior número de doses. A seguir estão apresentados os resultados referentes às avaliações realizadas.

4.2.3.1- Avaliação da resposta imune humoral

Para este protocolo a avaliação da resposta imune humoral foi baseada na pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps* por teste ELISA e Imunoblot, relação IgG1 e IgG2a e, análise do índice de avidez.

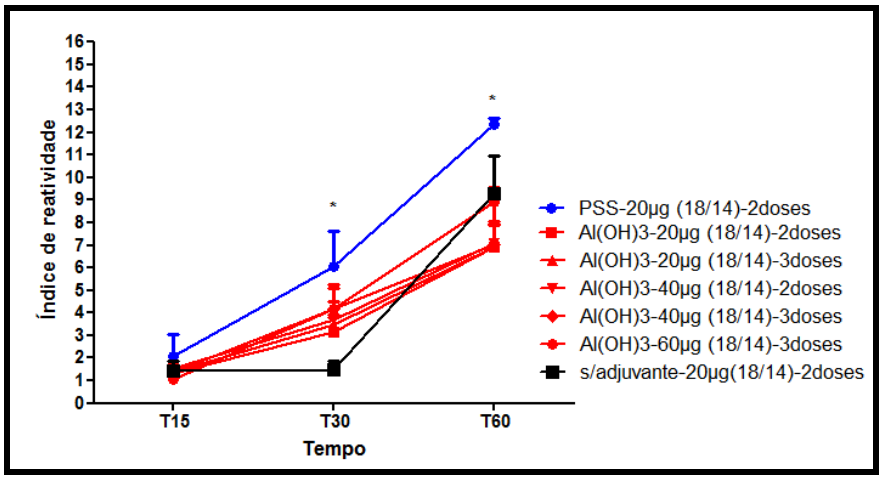


Figura 13- Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno 18/14 e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização subcutânea com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes. Dados apresentados por média ± desvio padrão (barras). Dados entre os grupos com diferença significativa (*).

De acordo com a figura 13, no T15 os IR variaram entre 1,1 e 2,1. Os valores mais altos foram obtidos com o grupo imunizado com o auxílio de PSS/DDA, embora não haja diferença significativa entre os grupos analisados ($p>0,05$).

No T30, os valores de IR variaram entre 1,5 e 6,1 e no T60 entre 6,8 e 12, 5. Entre os grupos que foram imunizados com 2 doses de 20µg de 18/14, os IR foram obtidos de forma decrescente com PSS/DDA, $Al(OH)_3$ e sem adjuvante ($p<0,001$). Não houve diferença significativa com os grupos imunizados entre duas ou três doses utilizando a mesma concentração antigênica (20 ou 40µg), da mesma forma entre os diferentes grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$, exceto com o grupo imunizado com 60µg de 18/14, visto apresentar maior índice no T60 ($p<0,01$).

Na tabela 15 estão apresentados os resultados obtidos com os índices de avidez e com as relações IgG1 e IgG2a obtidos com os *pool* coletados no T30 e T60 dos grupos imunizados de acordo com o protocolo III.

Tabela 15- Índices de avidez e relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes.

Adjuvante	18/14 (dose)	IgG1/IgG2a T30	Avidez T30	IgG1/IgG2a T60	Avidez T60
PSS/DDA	20µg (2 doses)	1,1	65,0%	0,5	100,0%
$Al(OH)_3$	20µg (2 doses)	1,0	60,0%	1,3	100,0%
	20µg (3 doses)	2,0	65,0%	0,6	100,0%
	40µg (2 doses)	1,1	60,0%	1,5	100,0%
	40µg (3 doses)	2,0	68,0%	0,7	100,0%
	60µg (3 doses)	2,7	65,0%	0,9	100,0%
Sem adjuvante	20µg (2 doses)	0,8	Negativo	0,6	Negativo

Legenda: Grupos que apresentaram relação IgG1 e IgG2a acima de 1,0 (vermelho), índices de avidez inferiores a 60,0% foram considerados negativos, grupos que apresentaram acima de 90,0% de índice de proteção concomitantemente com os valores da relação IgG1 e IgG2a acima de 1,0 no T30 e inferior a 1,0 no T60 (sublinhado).

Dos sete grupos imunizados de acordo com o protocolo III, todos apresentaram índices de avidez maiores do que 60,0% no T30 e 100,0% no T60, exceto o grupo imunizado com 20µg de 18/14, duas doses, sem o auxílio de adjuvantes, que apresentou índice negativo. As relações IgG1 e IgG2a no T30 foram acima do que 1,0, exceto para o grupo imunizado sem o auxílio de adjuvantes, enquanto que no T60 as relações IgG1 e IgG2a variaram entre 0,5 e 1,5, sendo que os valores acima do que 1,0 foram obtidos com os grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$ (tabela 15). Os três grupos que obtiveram IP maiores do que 90,0% apresentaram relações IgG e IgG2a no T30 acima que 1,0 e no T60 menores do que 1,0 (sublinhados na tabela 15).

Na tabela 16 estão evidenciados os resultados de reatividade em Imunoblot com LV-total do *pool* das amostras de soro coletadas no T15, T30 e T60 dos grupos imunizados de acordo com o protocolo III.

Tabela 16- Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* de amostras de soro de camundongos imunizados com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias.

Adjuvante	18/14 (dose)	T15 (kDa)	T30 (kDa)	T60 (kDa)
PSS/DDA	20µg (2 doses)	18	14, 18, 30	14, 18, 30
$Al(OH)_3$	20µg (2 doses)	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30
	20µg (3 doses)	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30
	40µg (2 doses)	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30
	40µg (3 doses)	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30
	60µg (3 doses)	14, 18	14, 18, 30	14, 18, 30
Sem adjuvante	20µg (2 doses)	18	14, 18, 30	14, 18, 30

A tabela 16 apresenta no T15 o reconhecimento das proteínas de 14 e 18kDa, por todos os grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$, e da proteína de 14kDa, pelos grupos imunizados com o auxílio de PSS/DDA ou sem adjuvantes. No T30 e T60 todos os *pool* reconheceram as proteínas de 14, 18 e 30kDa.

4.2.3.2.- Avaliação da resposta imune celular

Para a avaliação da resposta imune celular dos grupos imunizados de acordo com o protocolo III foram analisadas: a proliferação celular, a dosagem de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ, além do HTT.

Para os ensaios de proliferação celular foram utilizadas as células coletadas dos linfonodos poplíteos e inguinais e do baço no T60 dos grupos imunizados com 20 e 40µg de 18/14, duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ e desafiados com dez cisticercos de *T. crassiceps*. As células foram estimuladas com 20µg de 18/14 ou LV-total. Na tabela 17 constam os resultados dos IE obtidos.

Tabela 17- Índices de estimulação das células de linfonodos (Ly) ou de baço estimuladas com 20µg de18/14 ou LV-total referentes aos grupos imunizados com 20 ou 40µg de 18/14, duas doses, em $Al(OH)_3$.

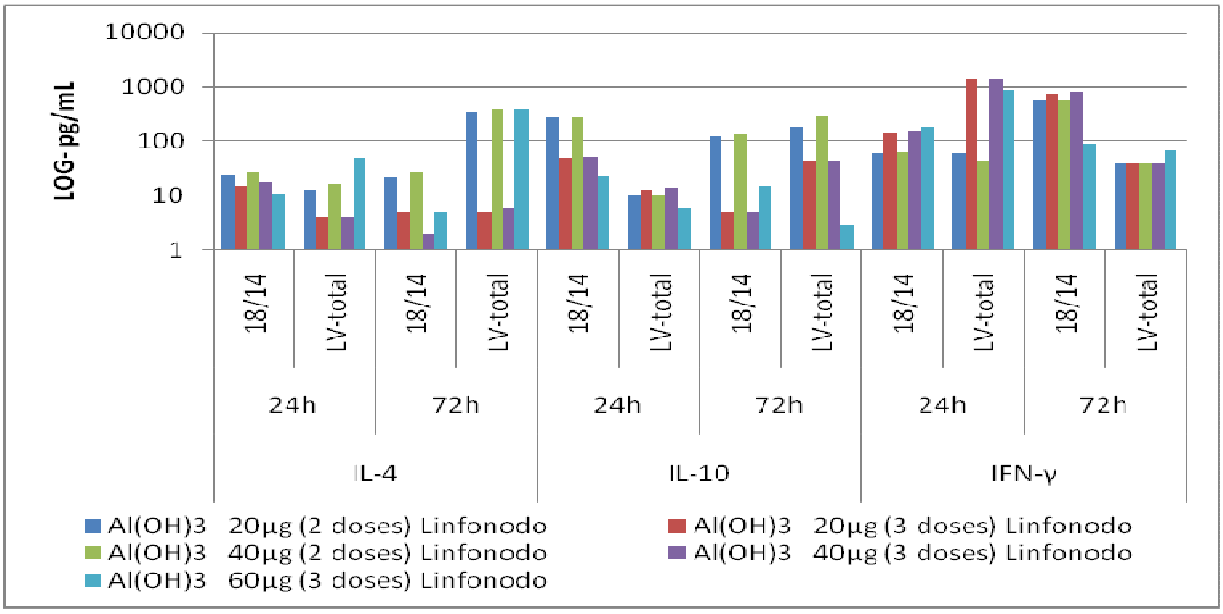
Adjuvante	**18/14 (dose)**	**T60**			
		18/14 (20µg/mL)		**LV-total (20µg/mL)**	
		Ly	Baço	Ly	Baço
$Al(OH)_3$	20µg (2 doses)	**2,71**	**1,50**	**0,20**	**0,01**
	40µg (2 doses)	**2,83**	**1,61**	**0,21**	**0,01**

Legenda: Valores considerados positivos de acordo com BAIG *et al*, 2006 (vermelho), grupos imunizados e desafiados (negrito).

No T60 foram obtidos IE positivos quando utilizadas as culturas de células de linfonodos estimuladas com 18/14. Não houve proliferação das células obtidas de linfonodos estimuladas com LV-total e com as células esplênicas estimuladas com 18/14 ou LV-total (tabela 17).

Na figura 14 estão apresentados os resultados das dosagens de citocinas IL-4, IL-10 e IFN-γ em sobrenadantes de cultura de células obtidas de linfonodos ou baço estimuladas com 18/14 ou LV-total por 24 ou 72 horas dos cinco grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$.

A



B

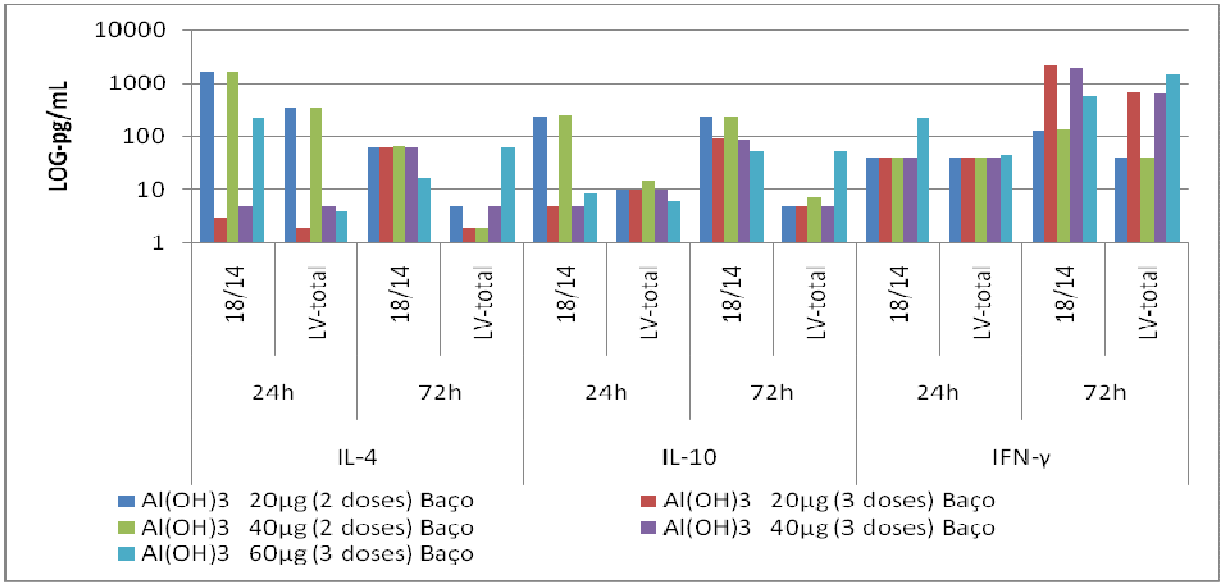


Figura 14- Dosagem de IL-4, IL-10 e IFN-γ em sobrenadantes de cultura de células obtidas de linfonodos (A) ou de baço (B) referentes aos grupos imunizados com 20, 40 ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$ e desafiados (T60), estimuladas com antígeno 18/14 ou LV-total por 24h ou 72h.

A dosagem de IL-4 foi menor do que 100pg/mL após 24 e 72 horas de estímulo das células de linfonodos com 18/14 e após 24 horas de estímulo com LV-total. Após 72 horas de estímulo das células de linfonodos com LV-total obtidas dos grupos imunizados com 20µg (2 doses), 40µg (2 doses) e 60µg (3 doses), a dosagem de IL-4 foi acima de 100pg/mL (figura 14A). Utilizando as células esplênicas obtidas dos grupos imunizados com 20µg (2 doses) e 40µg (2 doses) a

dosagem de IL-4 foi acima de 1000pg/mL e do grupo imunizado com 60µg (3 doses) a dosagem foi superior a 100pg/mL, após 24h de estímulo com 18/14. Após 72h, as células esplênicas obtidas dos grupos analisados obtiveram dosagem de IL-4 menor do que 100pg/mL (figura 14B).

A dosagem de IL-10 foi superior a 100pg/mL quando utilizados os sobrenadantes das culturas de células obtidas de linfonodos ou esplênicas pertencentes aos grupos imunizados com 20µg (2 doses) e 40µg (2 doses) estimuladas com 18/14 por 24 ou 72 horas. Os sobrenadantes dos demais grupos apresentaram dosagens de IL-10 menores do que 100pg/mL. Os sobrenadantes das culturas de células obtidas de linfonodos ou esplênicas pertencentes aos grupos analisados e estimulados com LV-total por 24 ou 72 horas apresentaram dosagens de IL-10 menores do que 100pg/mL, exceto os sobrenadantes das células obtidas de linfonodos dos grupos imunizados com 20µg (2 doses) e 40µg (2 doses) estimuladas por LV-total por 24 horas (figura 14A e 14B).

Todas as dosagens de IFN-γ foram acima de 10pg/mL, sendo que com os sobrenadantes obtidos das células de linfonodos estimuladas com 18/14 por 24 horas dos grupos imunizados com 20µg, 40µg ou 60µg (3 doses) as dosagens de IFN-γ foram superiores a 100pg/mL, enquanto que os mesmos grupos sob estímulo de LV-total por 24 horas apresentaram respectivamente, as dosagens acima de 1000pg/mL, 1000pg/mL e 100pg/mL (figura 14A). Os sobrenadantes das culturas de células esplênicas obtidas dos grupos analisados apresentaram dosagens de IFN-γ acima de 100pg/mL após estímulo com 18/14 ou LV-total por 24 horas, exceto o grupo imunizado com 60µg (3 doses) (figura 14A e 14B). Após 72 horas de estímulo com 18/14 os sobrenadantes das células obtidas de linfonodos ou esplênicas apresentaram dosagens superiores a 100pg/mL, exceto as células de linfonodos do grupo imunizado com 60µg (3 doses). Quando as células obtidas de linfonodos foram estimuladas com LV-total por 72 horas, as dosagens foram acima de 100pg/mL, enquanto que ao utilizar as células esplênicas dos grupos imunizados com 20µg e 40µg (3 doses) foram superiores a 100pg/mL e com 60µg (3 doses) a dosagem foi acima de 1000pg/mL.

A figura 15 ilustra os resultados de HTT dos grupos imunizados de acordo com o protocolo III. Os grupos imunizados com duas doses foram submetidos ao teste no T7 e T60, enquanto que os grupos imunizados com três doses, adicionalmente no T120.

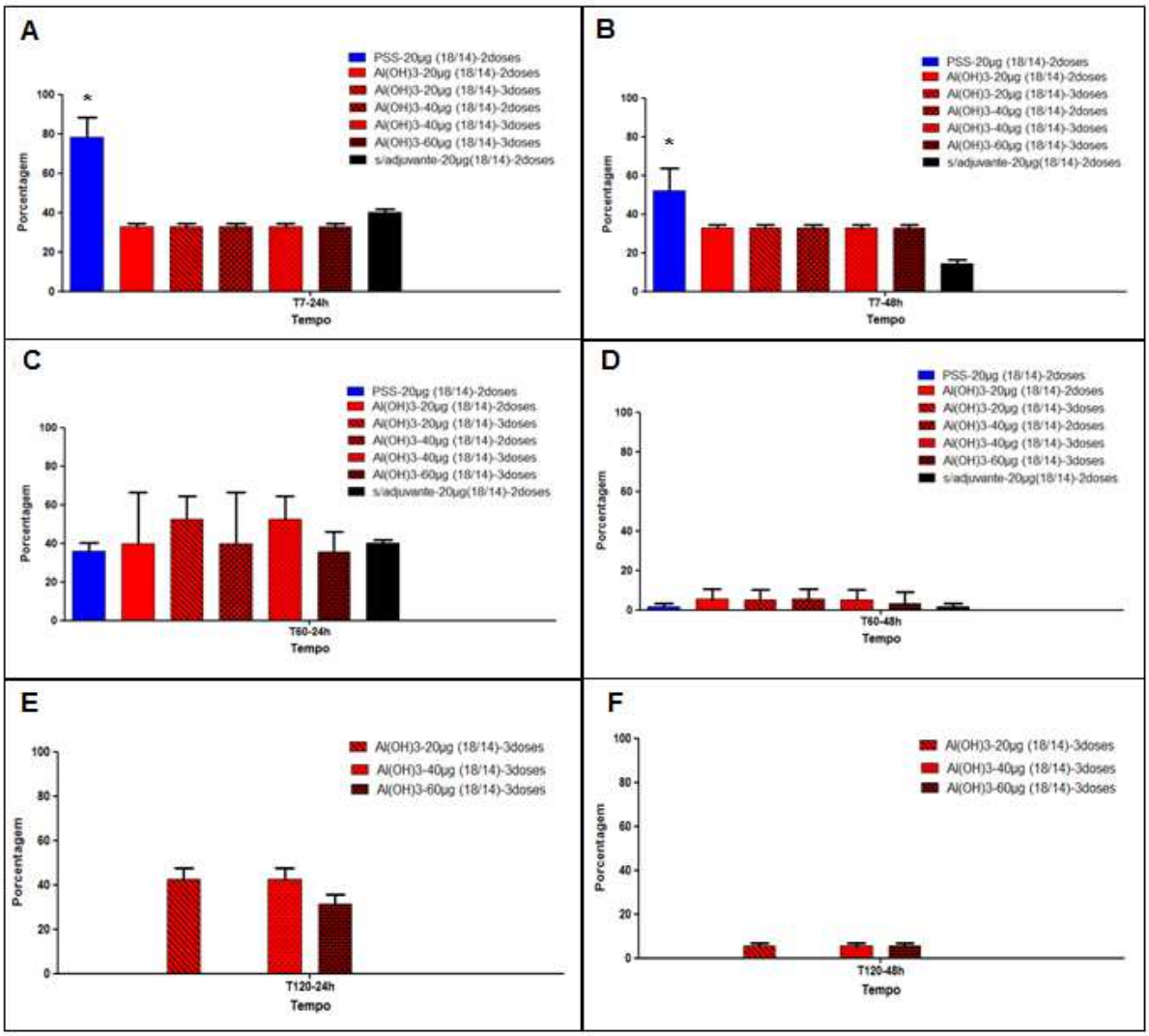


Figura 15- Porcentagem de edema subplantar após o teste de hipersensibilidade tardia (20µg de 18/14) aplicado após sete dias (T7), com leitura após 24h (A) e 48h (B), sessenta dias (T60), com leitura após 24h (C) e 48h (D) e cento e vinte dias (T120), com leituras após 24h (E) e 48h (F), contados a partir da imunização com 20, 40 ou 60µg de18/14, duas ou três doses, com auxílio do adjuvante $Al(OH)_3$. Dados apresentados por média ± desvio padrão (traços). Dados com diferença significativa (*).

No T7 – 24 horas (figura 15A), apenas dois grupos imunizados com 20µg de 18/14 (com o auxílio de PSS/DDA ou sem adjuvante) dos três grupos com duas doses, apresentaram HTT superiores a 40,0%, sendo que no T7 – 48 horas (figura 15B), um destes grupos (imunizado com PSS/DDA) manteve-se menor do que 40,0%. Os grupos imunizados com três doses de 20, 40 ou 60µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$ tiveram HTT menores do que 40,0% no T7 após 24 e 48 horas. Independente da concentração antigênica, HTT foram obtidos de forma decrescente com PSS/DDA ($p<0,01$), $Al(OH)_3$ e sem adjuvante no T7, após 24 e 48 horas.

No T60 - 24 horas (figura 15C) os dados foram acima de 40,0% para os grupos imunizados com 20 e 40µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$, enquanto que com 60µg o resultado de HTT foi menor do que 40,0%. Os grupos imunizados com $Al(OH)_3$ não apresentaram diferença significativa entre as doses e concentrações antigênicas nos diferentes tempos de análise (p>0,05).

Os grupos analisados no T120- 24h (figura 15 E) apresentaram HTT menores do que 60,0%, sendo que não houve diferença significativa (p>0,05). No T60 e T120– 48h (figura 15D e 15F) todos os grupos analisados obtiveram HTT menores a 40,0%, enquanto que no T120 – 24h, dos três grupos imunizados com três doses analisados, dois (20 e 40µg) apresentaram HTT menores a 40,0%, sem diferença significativa (p>0,05).

4.2.3.3- Índices de proteção

Na tabela 18 estão apresentados os resultados dos IP dos grupos imunizados de acordo com o protocolo III e desafiados após trinta dias com dez cisticercos de *T. crassiceps.*

Tabela 18- Índices de proteção obtidos após imunização ativa subcutânea com 20, 40 e/ou 60µg de 18/14, duas ou três doses, com adjuvante PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes e desafio com cisticercos de *Taenia crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose.

.

Adjuvante	18/14 (dose)	Índice de proteção Média (± desvio padrão)
PSS/DDA	20µg (2 doses)	73,6% (± 16,4)
$Al(OH)_3$	20µg (2 doses)	78,0% (± 6,4)
	20µg (3 doses)	100,0%** (± 0,0)
	40µg (2 doses)	78,2% (± 4,2)
	40µg (3 doses)	100,0%** (± 0,0)
	60µg (3 doses)	100,0%** (± 0,0)
Sem adjuvante	20µg (2 doses)	70,8%* (± 19,8)

Legenda: índice de proteção calculado com presença de um dos cinco (*) ou cinco dos cinco (**) camundongos com 100,0% de proteção (ausência total de cisticercos).

A tabela 18 demonstra que os grupos imunizados com duas doses de 20µg de 18/14 com auxílio de PSS/DDA, $Al(OH)_3$ ou sem adjuvantes apresentaram IP, respectivamente de, 73,6%, 78,0% e 70,8%. O grupo imunizado com duas doses de

40µg de 18/14 com auxílio de $Al(OH)_3$ apresentou IP de 78,2%. Não houve diferença significativa entre os grupos imunizados com duas doses antigênicas ($p>0,05$). Os grupos imunizados com três doses de 20, 40 ou 60µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$ apresentaram IP de 100,0%.

4.3- Protocolo de imunização ativa oral

Para o protocolo de imunização ativa oral foi utilizado o antígeno LV-total devido à maior diversidade proteica e assim maior probabilidade de imunização, visto que pela via oral há maior chance de degradação antigênica devido à variação de pH de mucosa, quando comparado à via subcutânea. Foram imunizados seis grupos com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$.

4.3.1- Avaliação da resposta imune humoral

A avaliação foi baseada na resposta imune humoral de acordo com os parâmetros de pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* por teste ELISA e Imunoblot, pesquisa das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) e índices de avidez.

A figura 16 ilustra os IR obtidos em teste ELISA com antígeno LV-total e amostras de soro (T15, T30 e T60) coletadas dos seis grupos imunizados pela via oral com LV-total com o auxílio de $Al(OH)_3$.

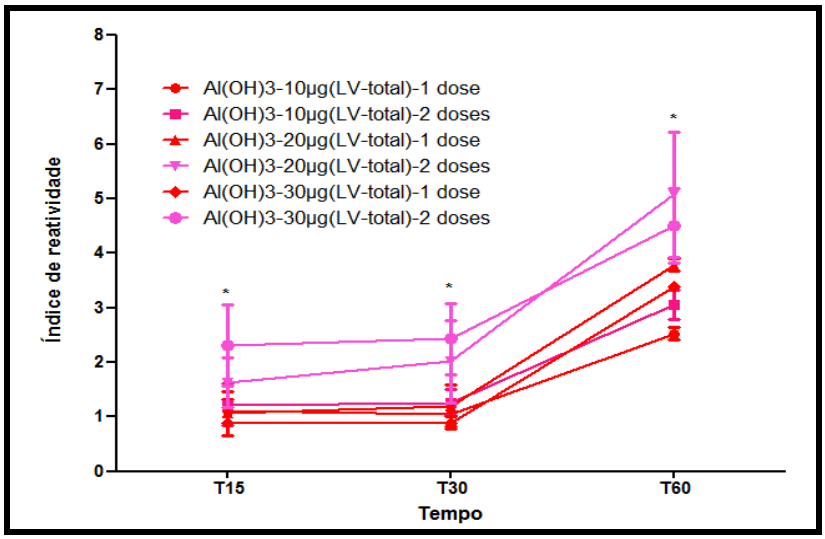


Figura 16- Índices de reatividade obtidos em teste ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T.crassiceps* utilizando antígeno LV-total e amostras de soro de camundongos Balb/c diluídas 1:50 coletadas após 15 (T15), 30 (T30) e 60 (T60) dias, contados a partir da imunização oral com 10, 20 ou 30µg de18/14, uma ou duas doses, com adjuvante $Al(OH)_3$. Dados apresentados por média ± desvio padrão (barras). Diferença significativa entre os grupos (*).

No T15 e T30 os IR variaram de 0,90 a 2,40, enquanto que no T60 os valores variaram de 2,60 a 5,10 (figura 16). Os grupos imunizados com uma dose de 10, 20 ou 30µg não apresentaram diferença significativa entre as concentrações utilizadas ($p>0,05$), exceto entre 10 e 20µg no T60 ($p<0,001$).

Os grupos imunizados com duas doses de 10 ou 20µg apresentaram diferença significativa ($p<0,01$) no T60, enquanto que os grupos imunizados com 20 ou 30µg variaram ($p<0,001$) no T15, T30 e T60 de acordo com o aumento da concentração antigênica (figura 16).

Na tabela 19 estão expostos os dados de relação IgG1 e IgG2a obtidos dos grupos imunizados por via oral.

Tabela 19- Relações IgG1 e IgG2a utilizando *pool* de amostras de soro coletadas no T30 e T60 de camundongos imunizados por via oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o adjuvante $Al(OH)_3$.

Adjuvante	*LV-total (dose)*	*IgG1/IgG2a*	*IgG1/IgG2a*
		T30	**T60**
Al $(OH)_3$	10µg (1 dose)	0,99	NC
	10µg (2 doses)	0,97	0,55
	20µg (1 dose)	0,98	NC
	20µg (2 doses)	0,70	0,99
	30µg (1 dose)	0,98	NC
	30µg (2 doses)	0,96	0,43

Legenda: Não consta resultado com esta amostra (Nc)..

No T30 e T60 ocorre predomínio de IgG2a (relação menor do que 1,0) e assim, perfil de polarização de resposta imune Th1 (tabela 19).

Os índices de avidez dos grupos imunizados por via oral foram considerados negativos, menores do que 60,0% no T30 e T60.

Na tabela 20 estão apresentados os resultados de reatividade em Imunoblot utilizando *pool* das amostras de soro coletadas no T15, T30 e T60 dos camundongos pertencentes aos seis grupos imunizados por via oral.

Tabela 20– Reatividade em Imunoblot com LV-total utilizando *pool* das amostras de soro de camundongos imunizados por via oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o adjuvante $Al(OH)_3$, coletadas após 15 (T15), 30 (T30) ou 60 (T60) dias.

Adjuvante	*LV-total (dose)*	**T15 (kDa)**	**T30 (kDa)**	**T60 (kDa)**
Al $(OH)_3$	10µg (1 dose)	---	---	Nc
	10µg (2 doses)	---	---	14,18,30,>40
	20µg (1 dose)	---	---	Nc
	20µg (2 doses)	---	>40	14,18,30,>40
	30µg (1 dose)	---	---	Nc
	30µg (2 doses)	---	---	14,18,30,>40

Legenda: Ausência de reatividade (---) e não consta resultado com esta amostra (Nc).

Não houve reatividade em Imunoblot com LV-total e *pool* de amostras de soro dos grupos imunizados por via oral coletadas no T15 e T30, exceto com o grupo imunizado com 20µg de LV-total, 2 doses, no qual os anticorpos presentes reconheceram as proteínas acima de 40kDa. No T60 foram ensaiados três *pool* de amostras de soro de grupos imunizados com duas doses de 10, 20 ou 30 µg, sendo

que todos apresentaram reatividade com as proteínas de 14, 18, 30 e acima de 40kDa (tabela 20).

4.3.2- Índices de proteção

Na tabela 21 estão apresentados os IP obtidos com os grupos imunizados pela via oral.

Tabela 21 - Índices de proteção obtidos após imunização ativa oral com 10, 20 ou 30µg de LV-total, uma ou duas doses, com o auxílio de $Al(OH)_3$ e desafio com cisticercos de *Taenia crassiceps* após 30 dias contados a partir da última dose.

Adjuvante	LV-total	Índice de proteção Média (± desvio padrão)
$Al(OH)_3$	10µg (1 dose)	48,3% (± 29,4)
	10µg (2 doses)	78,8% (± 9,0)
	20µg (1 dose)	76,1%* (± 33,7)
	20µg (2 doses)	76,6%** (± 22,8)
	30µg (1 dose)	76,5%** (± 31,9)
	30µg (2 doses)	100,0%*** (± 0,0)

Legenda: Índice de proteção com presença de um dos cinco (*), dois dos cinco (**) ou cinco dos cinco (***) camundongos com 100,0% de proteção (ausência total dos cisticercos).

Os IP variaram entre 48,3% e 100,0% (tabela 21). Os grupos imunizados com 10µg de LV-total variaram entre 48,3% (1 dose) e 78,8% (2 doses), com 20µg de LV-total entre 76,1% (1 dose) e 76,6% (2 doses) e com 30µg de LV-total entre 76,5% (1 dose) e 100,0% (2 doses). Não houve diferença significativa entre os grupos, exceto com o grupo imunizado com duas doses de 30µg, o qual apresentou 100,0% de proteção ($p<0,05$).

Em relação à avaliação da resposta imune celular, os grupos foram submetidos ao HTT após trinta dias da última ou única dose, porém, todos os grupos apresentaram após 24h e 48h índices inferiores a 40,0%.

4.4- Protocolo de imunização passiva

Sete grupos foram imunizados de forma passiva com os anticorpos anti-ES-Tcra ou anti-microcistina (tabela 22). Os IP variaram entre 58,0% e 93,0%, exceto no grupo imunizado apenas com uma dose de 250µg de anti-ES-Tcra (0,0%)

Tabela 22- Índices de proteção obtidos após imunização passiva com anticorpos monoclonais anti ES-Tcra e anti-microcistina.

Desafio	Imunização	AcMo	Dose	Camundongo (índice de proteção)	Índices de proteção Média (± desvio padrão)
10 cisticercos bloqueados com 50µg de anti-ES-Tcra	Bloqueio	---	---	1 (100,0%) 2 (29,0%) 3 (44,0%)	58,0%* (± 37,4)
10 cisticercos bloqueados com 100µg de anti-ES-Tcra	Bloqueio	---	---	1 (100,0%) 2 (32,0%) 3 (44,0%)	59,0%* (± 36,1)
10 cisticercos	Passiva	Anti-ES-Tcra (250µg)	1	1 (0,0%) 2 (0,0%) 3 (0,0%)	0,0% (± 0,0)
10 cisticercos	Passiva	Anti-ES-Tcra (50µg)	8	1 (94,0%) 2 (92,0%) 3 (94,0%)	93,0% (± 0,80)
10 cisticercos	Passiva	Anti-ES-Tcra (100µg)	8	1 (85,0%) 2 (83,0%) 3 (100,0%)	90,0%* (± 9,1)
10 cisticercos	Passiva	Anti-ES-Tcra (200µg)	8	1 (91,0%) 2 (87,0%) 3 (84,0%)	87,0% (± 3,6)
10 cisticercos	Passiva	Anti-microcistina (100µg)	8	1 (84,0%) 2 (79,0%) 3 (96,0%)	86,0% (±9,0)

Legenda: Anticorpo monoclonal (AcMo), não aplicado para o grupo (---) e índice de proteção com presença de um dos três camundongos com 100,0% de proteção (*).

Considerando os desvios-padrão, os grupos analisados possuem potencial para apresentar IP acima de 90,0% (tabela 22), exceto o grupo imunizado com apenas uma dose de anti-ES-Tcra (250µg). Os grupos analisados não apresentaram reatividade em teste ELISA para pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps*.

4.5 – Protocolos de imunização ativa e passiva: dados resumidos

Na tabela 23 está apresentado um resumo dos dados obtidos com os diferentes grupos imunizados de acordo com os protocolos de imunização ativa e passiva. Este resumo auxilia na observação das principais diferenças obtidas entre os grupos.

Tabela 23- Dados obtidos com os protocolos de imunização ativa e passiva referentes a pesquisa de anticorpos (IgG), relação IgG1 e IgG2a (IgG1/IgG2a), índice de avidez (avidez), índice de estimulação (IE) e índice de proteção (IP).

Protocolo	Adjuvante	18/14 (dose)	N° de doses	IgG			IgG1/IgG2a		Avidez T30		IE Ly +18/14		IP
Imunização Ativa subcutânea				**T15**	**T30**	**T60**	**T30**	**T60**	**T30**	**T60**	**T60**	**T90**	
1	PSS/DDA	10µg	1		*	*	>1,0	>1,0	+	+	+	+	-
	$Al(OH)_3$	10µg	1		*	*	>1,0	>1,0	-	+	+	+	-
	Sem adjuvante	10µg	1				>1,0	>1,0	-	-	+	+	-
2	DODAB	5µg	1	*			>2,0	<1,0	+	+	+	Nc	+
		10µg	1	*			>1,0	<1,0	+	+	+	Nc	+
		20µg	1	*			>2,0	<1,0	+	+	-	Nc	+
	PSS/DDA	5µg	1		*		>2,0	>2,0	+	+	+	Nc	-
		10µg	1			*	>1,0	<1,0	+	+	+	Nc	-
		20µg	1				>1,0	<1,0	+	+	-	Nc	-
	$Al(OH)_3$	5µg	1				>1,0	<1,0	+	+	+	Nc	+
		10µg	1			*	>1,0	<1,0	+	+	-	Nc	+
		20µg	1				>1,0	<1,0	+	+	-	Nc	-
3	PSS/DDA	20µg	2		*	*	>1,0	<1,0	+	+	Nc	Nc	-
	$Al(OH)_3$	20µg	2				>1,0	>1,0	+	+	+	Nc	-
		20µg	3				>2,0	<1,0	+	+	Nc	Nc	+
		40µg	2				>1,0	>1,0	+	+	+	Nc	-
		40µg	3				>2,0	<1,0	+	+	Nc	Nc	+
		60µg	3			*	>2,0	<1,0	+	+	Nc	Nc	+
	Sem adjuvante	20µg	2				<1,0	<1,0	-	-	Nc	Nc	-
Imunização ativa oral	$Al(OH)_3$	10µg	1				<1,0	Nc	-	-	Nc	Nc	-
		10µg	2				<1,0	<1,0	-	-	Nc	Nc	-
		20µg	1				<1,0	Nc	-	-	Nc	Nc	-
		20µg	2				<1,0	<1,0	-	-	Nc	Nc	-
		30µg	1				<1,0	Nc	-	-	Nc	Nc	-
		30µg	2	*	*	*	<1,0	<1,0	-	-	Nc	Nc	+
Imunização passiva	Anti-ES-Tcra	50µg	8	-	-	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	+
		100µg	8	-	-	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	+
		200µg	8	-	-	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	-

Legenda: (*) grupos que apresentaram maiores índices de reatividade de acordo com o tempo (T), em dias, de coleta de amostra com diferença significativa ($p<0,05$); (em branco) sem diferença significativa entre grupos ($p>0,05$); (+) índice de avidez acima de 60,0%, IE acima de 2,5 ou IP com média acima de 90,0%, (-) resultado negativo de acordo com os parâmetros estabelecidos, (Nc) não consta resultado com este grupo.

5- DISCUSSÃO

O desenvolvimento de vacinas para o controle da cisticercose suína vem sendo considerada na literatura, como uma alternativa viável e com maior probabilidade de reduzir indiretamente e rapidamente os casos de cisticercose humana, principalmente da forma mais grave da doença, a NC (GONZALEZ et al., 2005; SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011).

Os resultados apresentados neste trabalho com o uso de antígeno bruto e purificado de *T. crassiceps* foram considerados promissores devido à apresentação dos IP induzidos por mediadores imunológicos específicos indicados pela produção de anticorpos, estímulos de proliferação de linfócitos T e produção de citocinas, em adição a mecanismos ainda desconhecidos para cisticercose murina e não previstos para esta pesquisa.

Nossa equipe, há mais de uma década, faz uso de antígenos de *T. crassiceps* como uma fonte antigênica parcialmente homóloga à de *T. solium,* reprodutível e eficaz para o diagnóstico de anticorpos em amostras de líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com NC (BUENO et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2005; PARDINI et al., 2002; VAZ et al., 1997). Após estes ensaios, foram considerados cumpridos os objetivos relacionados à obtenção de testes sorológicos com alta sensibilidade e especificidade, incluindo a utilização de antígenos brutos e purificados, até mesmo o uso de peptídeos sintéticos (FARIAS, 2006) e antígenos recombinantes (GOMES, 2011). Assim, neste segundo momento, estima-se desenvolver medidas profiláticas que sejam eficazes, com baixo custo, práticas e viáveis para aplicação em um país ainda com problemas sócio-econômicos, como é o caso do Brasil. Na tentativa de iniciar a busca por estes novos objetivos, este trabalho foi o primeiro do grupo a utilizar antígenos de *T. crassiceps* como medida profilática a fim de desenvolver vacinas anti-cisticercose.

5.1- Antígenos

Poder-se-ia traçar este estudo utilizando peptídeos sintéticos, antígenos recombinantes, antígenos brutos ou antígenos purificados, porém, para este início de desenvolvimento de medidas profiláticas, optou-se em um antígeno purificado (18/14) e um bruto (LV-total), para que desta maneira, fosse considerada a resposta imune protetora relacionada a uma grande variedade de proteínas (antígeno bruto) ou ainda direcionar a análise para proteínas específicas apenas de baixo peso molecular (antígeno purificado), claramente reconhecidas como imunogênicas e antigênicas (ESPINDOLA et al., 2005).

Reatividade cruzada entre líquido vesicular de *T. crassiceps* e extrato total de cisticercos de *T. solium* confirmam que os dois parasitas possuem epítopos em comum e que estão presentes em quantidade suficiente para serem utilizados no imunodiagnóstico ou para o desenvolvimento de vacinas para proteção em cisticercose murina e suína (PERALTA et al., 2009).

Consideraram-se as vantagens relacionadas com a utilização dos antígenos nativos. As proteínas presentes nos cisticercos são, na realidade, glicoproteínas. Assim, resíduos de açucares presentes entre a sequência de aminoácidos também são importantes na estrutura antigênica e, a inserção destes resíduos para a obtenção de peptídeos sintéticos, por exemplo, tornaria o processo mais difícil (CORREA et al., 2000). Além disto, as proteínas nativas mantêm os rearranjos naturais, que para obter de forma sintética, o estudo de estrutura-atividade resultaria em um alto custo, muitas vezes inviabilizando o uso. Devido a estas considerações, foi mantida a escolha para utilização de antígenos nativos. Outros autores já destacaram o importante potencial para o uso deste perfil antigênico em vacinas contra cisticercose suína (LIGHTOWLERS, 1994; VALDEZ et al., 1994).

A escolha do antígeno 18/14 (figura 7) para estes experimentos foi baseada nos resultados promissores previamente obtidos com esta fração proteica para o imunodiagnóstico da NC (ESPINDOLA et al., 2005; PARDINI et al; 2001), obtendo até 100,0% de sensibilidade e especificidade. Ainda considerando as vantagens, a proteína de 14kDa em gel 2-D demonstrou alta pureza, reduzindo assim, a possibilidade de interferentes nas avaliações vacinais (PERALTA et al., 2009),

porém, o baixo rendimento e a dificuldade de concentração antigênica por coluna de imunoafinidade são desvantagens importantes para relatar.

Em estudos anteriores, antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps*, que possui uma vasta quantidade de proteínas com massa molecular inferior a 10kDa até proteínas acima de 90kDa, após ser submetido a condições de redução, apresentou uma alta concentração de proteína de 18kDa (APTDDKRVIDLKK), que possui homologia parcial com a proteína de 10kDa de *T. solium* (APTDDKGPEDLKKKM), ambas com especificidade para amostras de pacientes com NC em diagnóstico laboratorial (PERALTA et al., 2009). Os dados de literatura sugerem que são as proteínas de baixo peso molecular que interagem mais intensamente com o hospedeiro em diferentes fases da evolução parasitária, consideradas ainda como proteínas de excreção e secreção do parasita (ESPINDOLA et al., 2002).

O antígeno LV-total apresentou frações proteicas constituídas por proteínas abaixo de 14kDa até acima de 96kDa (figura 7), sendo representado principalmente por proteínas acima de 30kDa, devido provavelmente à presença de frações de membrana do cisticerco que foram maceradas. Estes tegumentos podem participar de mecanismos de eliminação catabólica, absorção de nutrientes, bem como, podem estar relacionados com a evasão da resposta imunológica do hospedeiro (VAZ et al., 1997). LV-total é constituído de uma vasta complexidade antigênica e ainda, com alto rendimento e baixo custo, pontos importantes para o prosseguimento dos estudos em vacina. Assim como os demais antígenos de *T. crassiceps*, o antígeno LV-total foi considerado seguro, visto que nos camundongos utilizados não foi visualizada morte precoce ou mudança de comportamento alimentar dos integrantes dos grupos experimentais. Este resultado já seria esperado, visto que doses sequenciais, 10 a 20µg de líquido vesicular de *T. crassiceps*, foram previamente aplicadas por outros autores para a obtenção de anticorpos monoclonais, mantendo a integridade tecidual do animal (ESPINDOLA et al., 2002).

O rendimento da extração do antígeno LV-total (3.200µg/mL) foi superior a do antígeno 18/14 (1.000 µg/mL) devido às próprias limitações da técnica de purificação. Espindola e colaboradores (2005) destacaram que entre o total de proteínas presentes em extrato de líquido vesicular de *T. crassiceps*, as proteínas inferiores a 18kDa correspondem de 39,0% a 43,0%, porém, ao incluir as perdas

decorrentes ao processo de purificação, o rendimento pode ser ainda inferior, porém, com alta sensibilidade e especificidade, sendo portanto, as vantagens mais relevantes do que as desvantagens.

Assim, inicialmente os imunógenos foram selecionados e propostas duas vias de imunização ativa: via subcutânea e via oral. A avaliação da imunogenicidade obtida de acordo com os protocolos de imunização propostos foi baseada nas variações decorrentes da resposta imune humoral, da resposta imune celular e do índice de proteção, sendo a proteção obtida relacionada ainda a outros parâmetros não conhecidos.

5.2- Protocolos de imunização ativa subcutânea: Avaliação da resposta imune humoral

A escolha da via subcutânea foi baseada na facilidade de aplicação, principalmente quando deslumbrada a possibilidade de estudo em suínos. Alguns autores consideram a aplicação intramuscular como a de maior facilidade (ASSANA et al., 2010), porém, ao analisar a via subcutânea, presume-se a eficiência da imunização, mesmo em casos em que o antígeno não tenha atingido porções mais profundas do epitélio. Cruz-Revilla e colaboradores (2000) verificaram que em imunizações com DNA-*T. crassiceps*, a proteção anti-cisticercos foi ligeiramente maior quando o antígeno foi aplicado por via intradérmica (79,0%) do que quando aplicado por via intramuscular (63,0%), havendo, portanto, diferença de proteção, dependendo da profundidade do contato antigênico, das características relativas à própria via de administração e da interação com células de defesa de acordo com as camadas epiteliais.

Considera-se, devido aos resultados obtidos neste trabalho, que a imunização subcutânea é promissora para o desenvolvimento de vacinas anti-cisticercose, segundo as condições analisadas, obtendo IP variáveis a partir de 24,9% até acima de 90,0%, obtidos estes últimos valores em oito de 19 grupos analisados (tabelas 10, 14 e 18). Assim, presume-se que houve compatibilidade química com os produtos utilizados, estabilidade antigênica na suspensão, ainda que em pouco

tempo de processamento e baixa toxicidade *in vivo*, itens estes considerados importantes para viabilizar a produção de vacinas (HELDENS et al., 2008).

Para a análise da imunização ativa por via subcutânea foram propostos três protocolos de imunização. Para o protocolo I, a concentração de 10µg foi utilizada devido ao potencial para o estímulo de órgãos linfóides durante a produção de anticorpos monoclonais (ESPINDOLA et al., 2002) e, associado ao baixo rendimento da técnica e à dificuldade de purificação, apenas esta concentração foi utilizada inicialmente, porém, analisada de acordo com variações de adjuvantes. Baseando-se nos resultados de IP obtidos com este protocolo (tabela 10) estimou-se que 10µg de 18/14, embora estimule a resposta imune, seja ineficiente para a proteção de cisticercose murina ou ainda que a proteção induzida não seja duradoura por até 60 dias. Assim, para o protocolo II foram utilizadas três concentrações antigênicas (5, 10 ou 20µg de 18/14) em um esquema curto de desafio com cisticercos de *T. crassiceps*, 30 dias. Desta forma obteve-se até 100,0% de IP (tabela 14), porém, com até 10µg de dose antigênica e, proteção aparentemente instável a partir de 20µg, sugerindo a possibilidade de necessitar de maior número de doses, variável analisada pelo protocolo III.

5.2.1- Pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. crassiceps*

Os IR foram obtidos em teste ELISA com antígeno 18/14 e amostras de soro coletadas no T15, T30 e T60. Em relação aos três grupos imunizados pela via subcutânea, de acordo com o protocolo I, os IR não apresentaram diferença significativa no T15, porém, no T30 e T60 os maiores IR foram obtidos com os grupos imunizados com o auxílio de adjuvantes, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$, quando comparado ao grupo imunizado sem o auxílio de adjuvantes (figura 8).

Ao analisar os IR obtidos com as amostras de soro coletadas dos grupos imunizados de acordo com o protocolo II, não houve diferença significativa entre as variações das concentrações antigênicas, porém, ao analisar os grupos imunizados com 5µg foi possível verificar maior IR com os grupos imunizados com o auxílio de DODAB no T15, PSS/DDA no T30 e quando utilizado 10µg, PSS/DDA ou $Al(OH)_3$ no T60 (figura 10). Com base nas demais concentrações, os dados obtidos com os

adjuvantes foram considerados semelhantes, sendo todos eficientes para induzir resposta imune humoral.

Considerando o protocolo III, não houve diferença significativa entre os IR no T15, sendo no T30 e T60, maiores quando obtidos com o grupo imunizado com o auxílio de PSS/DDA em relação aos grupos imunizados com $Al(OH)_3$ ou sem o auxílio de adjuvantes, independente do número de doses e concentração antigênica entre 20 e 40µg de 18/14. Variação de IR comparado aos demais grupos foi possível verificar quando o grupo foi imunizado com 60µg e três doses (figura 13).

Lincopan e colaboradores (2007, 2009) obtiveram IR semelhantes entre grupos imunizados com o auxílio de $Al(OH)_3$ e PSS/DDA, porém menores quando os camundongos foram estimulados com DODAB ao invés de $Al(OH)_3$. Aparentemente o alto grau de organização das partículas de PSS/DDA pode ser considerado vantajoso para a apresentação de antígenos para o sistema imunológico. Os resultados obtidos neste trabalho também sugerem análise semelhante, embora com a utilização de DODAB os IR possam ser obtidos de forma mais expressiva quando a análise ocorra de forma precoce (T15) (figura 8, 10 e 13).

Para algumas doenças como a malária e o HIV, apenas o estímulo de resposta imune humoral é considerado insuficiente, o que ocorre também para o caso da cisticercose murina, sendo, portanto, o estudo de novos adjuvantes como uma proposta interessante para o desenvolvimento de técnicas de vacinação para doenças infecciosas. Há anos o $Al(OH)_3$ é considerado um adjuvante capaz de potencializar a resposta imune humoral, aumentando a reatividade principalmente quando utilizado na primeira dose de imunização (GUPTA, 1998; SANCHEZ et al., 1980). Recentemente, novos adjuvantes, como à base de nanopartículas de cerâmica, foram utilizados para imunoterapia de alergias, sendo que este material destacou-se pela possibilidade de ativar mecanismos Th1 e Th2 (PANDEY et al., 2011).

Não houve correlação entre os IR e os IP (tabela 10, 14 e 18) obtidos individualmente para cisticercose murina. Esta heterogeneidade entre os níveis de proteção e dosagem de anticorpos já foi verificada por outros autores (CRUZ-REVILLA et al., 2000; FLISSER; LIGHTOWLERS, 2001; SCIUTTO et al., 1995). Aluja et al. (2005) não relacionaram a presença de anticorpos como fator determinante para a proteção, visto que o aumento de títulos pode ser proporcional com a presença das vesículas no hospedeiro (ALUJA et al., 1996; CRUZ-REVILLA

et al., 2000), porém, segundo Gauci e colaboradores (2008) os hospedeiros apenas poderão manter-se protegidos caso haja a presença de anticorpos e ativação de sistema complemento precocemente ao desenvolvimento dos cisticercos. Independente da confirmação das hipóteses, a pesquisa de anticorpos pode ser utilizada como um marcador de ativação de resposta imunológica ou da aplicação da própria dose vacinal (FLISSER et al., 2004).

Os IR foram maiores, independente da subclasse, no T60 do que no T30, devido à própria cinética de produção de imunoglobulinas, além do fato que nos primeiros 30 dias de infecção, os antígenos de *T. crassiceps* podem induzir tolerância ou supressão, quando é considerada a infecção natural. Como os antígenos aplicados neste estudo são constituintes do líquido de excreção e secreção dos parasitas (ESPINDOLA et al., 2002), esperava-se o mesmo perfil de resultados.

De acordo com o protocolo II pôde-se verificar de forma constante, com os três adjuvantes utilizados, que a maior concentração antigênica induziu menor IP (tabela 14). Este fato pode ser explicado pela distribuição da proteína nas partículas dos adjuvantes. Caso a proteína não esteja presente até uma determinada concentração, a adsorção com as partículas pode apresentar-se não uniforme e até mesmo possibilitar a formação de agregados que interrompem a ordenação e a dispersão do adjuvante. No caso de PSS/DDA o ideal seria inicialmente entre 0,0 a 25,0µg/mL de antígeno (LINCOPAN et al., 2007).

Sciutto e colaboradores (1995) publicaram dados semelhantes em relação ao aumento de concentração antigênica, como com os obtidos com o protocolo II, após imunizações com antígeno bruto de *T. solium*. Outra explicação ao fato foi salientada por Sun e colaboradores (2003). Segundo os pequisadores, a anergia de células T é precedida da própria ativação de células T e divisão celular em resposta ao antígeno, assim, os mecanismos de sensibilização e tolerância podem estar muito próximos, diferenciando apenas em ciclos celulares distintos e formas diferentes de indução dos receptores celulares, necessitando nas duas formas, a presença da proteína.

Assim, pressupõe-se que a proteção não esteja relacionada com o aumento ou diminuição da concentração antigênica, mas sim, à forma de apresentação para as células de defesa, sendo que quanto maior for a dispersão e a organização das partículas, melhor será a apresentação do epítopo e conseqüente maior

desempenho vacinal, desde que o epítopo aplicado seja protetor. Uma sugestão ainda possível seria a aplicação de mais de um adjuvante, com mecanismos diferentes de ativação de resposta imune, na tentativa de obter um efeito aditivo à dose vacinal (WEERATNA et al., 2000) ou ainda, o uso de extratos bacterianos (DALTON; MULCAHY, 2001).

A aplicação de uma segunda ou terceira dose não fez decrescer os IR obtidos com os grupos imunizados com base no protocolo III (figura 13) em relação ao tempo (T60). Isto foi considerado positivo, visto que a redução do IR obtida após a reaplicação do recombinante GST-Tso31, por outros pesquisadores, foi correlacionada parcialmente com a baixa proteção anti-cisticercose (37,0%), em virtude da interrupção de uma ativação precoce de resposta Th2 (MAYTA et al., 2007).

Índices de avidez maiores que 60,0% (tabela 7, 11 e 15) foram demonstrados no T30 em 16 dos 19 grupos e no T60 em 17 dos 19 grupos imunizados pela via subcutânea, sendo em todos os casos, os índices obtidos no T60 superiores aos apresentados no T30. Ao avaliar os dados obtidos com o protocolo I (tabela 7) sugere-se que com a utilização do adjuvante PSS/DDA, a afinidade dos sítios combinatórios presentes nos anticorpos anti-*T. crassiceps* pode ser obtida anteriormente à utilização de $Al(OH)_3$ e com base nos dados do protocolo II indica-se que com a utilização de DODAB, embora os IR possam ser inferiores (figura 10), a avidez pode ser obtida precocemente quando comparado ao uso de PSS/DDA.

As observações sobre os índices de avidez corroboram com a hipótese que o antígeno 18/14 pode estimular uma resposta imune humoral persistente, salientando ainda que os mesmos grupos analisados reconheceram em Imunoblot principalmente as proteínas específicas deste estímulo antigênico, 18 e 14kDa (tabela 8, 12 e 16).

Frações de alto peso possuem regiões homólogas às de baixo peso molecular (GREENE et al., 1999), porém, devido provavelmente ao rearranjo estrutural, as proteínas acima de 40kDa presentes no LV-total não foram reconhecidas em Imunoblot pelos *pool* de amostras de soro utilizadas. Pode ser que as proteínas de alto peso possam induzir outros mecanismos imunológicos, até mesmo protetores. Em outros estudos com imunizações utilizando antígenos recombinantes de *T. solium* (TSOL 18 e TSOL 45), amostras de soro de suínos reconheceram as proteínas de 20, 25, 35, 38 e 39kDa de *T. solium* (GONZALEZ et al., 2005),

enquanto que soros de camundongos obtidos após imunizações com recombinante de *T. crassiceps*, reconheceram proteína de 56 kDa de *T. solium* e 66 kDa de *T. crassiceps.* Após imunizações com recombinante de *T. solium* (paramiosina) foram reconhecidas as proteínas de 97 kDa de *T. solium* e *T. crassiceps* (ROSAS et al., 1998; SOLIS et al., 2005). Assim, além das proteínas de baixo peso, as de alto peso devem ser analisadas em próximos experimentos devido ao potencial de proteção também demonstrados em outras pesquisas.

5.2.2- Relação IgG1 e IgG2a

Em outros trabalhos, autores sugerem que a dosagem de IgG1 e IgG2a (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2003; ROSAS et al., 2002) ou IgG1, IgG2a e IgG2b (TERRAZAS et al., 1999) já seriam suficientes para comparação da polarização de resposta imune Th1 (IgG2a) ou Th2 (IgG1), sendo portanto, desnecessária a complementação de análise dos resultados com IgG3 e IgG4, diminuindo desta forma os custos das análises. Este trabalho foi realizado em camundongos Balb/c (hospedeiro experimental para *T. crassiceps*), que modulam naturalmente para resposta Th2 (HAZLETT; HENDRICKS, 2010). Assim, para a análise de subtipos de IgG (IgG1 e IgG2a) esperava-se que os maiores índices fossem de IgG1, o que foi confirmado com os dados obtidos no T30 (tabela 7, 11 e 15).

Para determinar o predomínio de uma determinada subclasse de IgG em cada fase, seria preferível, por exemplo, um ensaio de captura, devido ao desvio natural para pesquisa de IgG1 (suscetibilidade da espécie), porém, seria inviável para este momento do trabalho, devido ao volume das amostras de soro disponível, além do custo com outros conjugados e marcação de anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps*. Assim, a análise foi baseada nos IR obtidos em teste ELISA indireto, sob as mesmas condições de ensaio, e comparados os dados obtidos de IgG1 e IgG2a.

Durante a infecção, pesquisadores documentaram que Balb/c infectados com cisticercos de *T. crassiceps* desenvolvem altos títulos de IgG1 e em menor quantidade, IgG2a, assim como níveis crescentes de IL-4 e decrescentes de IFN-γ. Admite-se, desta forma, que a infecção natural polariza a resposta para Th2, provavelmente devido à reprodução parasitária (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2003).

De acordo com os resultados alcançados com os protocolos de imunização ativa subcutânea, a proteção contra cisticercose murina deve estar relacionada com *mix* de resposta Th1 e Th2, visto que os oito grupos (tabela 7, 11 e 15) que resultaram em IP acima de 90,0% apresentaram no T30 relação IgG1 e IgG2a maior do que 1,0 (perfil Th2) com desvio no T60 a dados inferiores a 1,0 (perfil Th1). Sugere-se de tal modo que a produção de anticorpos possa ser importante para a proteção murina, principalmente no início da resposta, mas, que mecanismos celulares devam contribuir de forma mais relevante e duradouro, sendo, portanto, o oposto ao que ocorre com a infecção natural (TERRAZAS et al., 1999).

Considerando que a resposta Th1 tenha um perfil protetor (TERRAZAS et al., 1999), com os resultados obtidos admite-se que o antígeno 18/14 pode ser explorado para estudos em vacinas anti-cisticercose suína, desde que a imunização ocorra pelo menos 60 dias antes do contato com o próprio parasita, ou seja, a vacina é direcionada para proteção visando suínos para uso comercial e não criação *in house*, visto que neste último caso, o contato anterior com o parasita já pode ter ocorrido e dificilmente verificado pelos criadores.

Terrazas e colaboradores (1999) analisaram a suscetibilidade de camundongos Balb/c desenvolverem cisticercos após tratamento com anti-IL10, resultando em produção celular de IL-2, IFN-γ, IgG2a e altos IP, enquanto que camundongos tratados com anti-IFN-γ apresentaram em cultura altos níveis de IL-10 e modulação de resposta para IgG1 e IgG2b, além de aumento de proliferação dos parasitas.

Adicionalmente, o predomínio de IgG1 foi observado em suínos imunizados apenas com fração proteica enquanto que o predomínio de IgG2a em suínos imunizados sequencialmente com vacinas baseadas em DNA e proteína, diferenciando inclusive na duração de resposta. Os resultados sugerem que a duração da resposta está correlacionada com o tipo de resposta imune induzida pela vacinação, sendo neste caso, com maior durabilidade quando associada com Th1 (GUO et al., 2004), da mesma forma que demonstrado nas tabelas 7, 11 e 15. Ressaltando ainda, Rosas e colaboradores (2002) demonstraram que imunização com DNA *pTso18* induziram leve, mas, detectáveis níveis de IgG1, porém, não foram associados diretamente com a proteção.

Valquez-Talavera (2001) verificou predomínio de IgG1 ao analisar os grupos imunizados com Paramiosina-recombinante (*T. solium*), porém, com IP de apenas 52,0%, enquanto que Wang e colaboradores (2003) verificaram o predomínio de

IgG2a, em grupos apresentando 73,0% de IP após imunização com antígeno recombinante (pcDNA2-cC1), assim, a resposta celular relacionada com perfil Th1, pode apresentar relevância para a proteção da infecção, mesmo não sendo exclusivamente satisfatório. Presume-se que os estudos de novos adjuvantes e frações proteicas tornam-se necessários para a polarização da resposta protetora mais adequada para a cisticercose.

A análise de polarização Th1/Th2 é complicada durante a infecção natural ou ainda em pacientes humanos. Os resultados de análise de líquido cefalorraquidiano coletado de pacientes com NC não apresentaram relação das subclasses de imunoglobulinas com a apresentação clínica, estágio ou localização dos cisticercos (CHAVARRIA et al., 2005). Notou-se fato semelhante nestes experimentos com camundongos, visto que não foi correlacionada a produção de IgG1 ou IgG2a de acordo com as variações dos estágios dos cisticercos encontrados após o desafio, como os calcificados, por exemplo (dados não mostrados).

Assim, de acordo com os resultados obtidos com os protocolos de imunização ativa por via subcutânea apresentados neste trabalho, não houve correlação da presença de anticorpos específicos para a proteção da cisticercose suína, provavelmente pelo fato dos anticorpos pesquisados serem decorrentes da exposição a antígenos abundantes de excreção e secreção do parasita. A pesquisa de anticorpos relacionada com o estímulo de proteínas fases-específicas do parasita poderia ser uma ferramenta mais apropriada para a compreensão dos mecanismos de resposta humoral (ROBINSON et al., 1997; ROSAS et al., 2002), porém, estas proteínas ainda não são completamente conhecidas a ponto de prosseguir neste momento com esta análise, sendo necessário novos estudos para avaliar as diferentes frações protéicas de forma individual.

5.3- Protocolos de imunização ativa subcutânea: avaliação da resposta imune celular

Analisando os resultados obtidos no T60 de 12 culturas de células dos grupos imunizados de acordo com o protocolo I, II ou III, foram obtidos IE positivos (IE acima de 2,5) em dez das culturas de linfonodos estimuladas com 18/14, quatro das

culturas de células esplênicas estimuladas com 18/14, quatro das culturas de linfonodos estimuladas com LV-total e duas das culturas de células esplênicas estimuladas com LV-total (tabela 9, 13 e 17). No T90 foram analisados três grupos imunizados de acordo com o protocolo I, sendo que foram positivas três das culturas de linfonodos estimuladas com 18/14 e uma das culturas de células esplênicas estimuladas com LV-total (tabela 9). Não houve proliferação das culturas de linfonodos estimuladas com LV-total e das culturas de células esplênicas estimuladas com 18/14. Assim, poderíamos direcionar os comentários para alguns pontos, até o momento, considerados como principais, sobre a proliferação celular dos grupos analisados:

1) O antígeno LV-total deve induzir imunossupressão, visto aos resultados obtidos quando o LV-total foi utilizado como mitógeno em cultura de células obtidas de grupos imunizados (tabela 9, 13 e 17). Esta imunossupressão deve estar relacionada com as proteínas de alto peso molecular, visto que utilizando antígeno purificado de alto peso (dados não mostrados) foram obtidos IE menores do que aqueles obtidos com LV-total. Outros fatores também podem estar relacionados com a supressão, como: presença de cistos no peritônio dos animais experimentais, visto que os grupos imunizados de acordo com o protocolo II ou III utilizados nos ensaios de linfoproliferação, já estavam desafiados no T60 com cisticercos de *T. crassiceps,* assim como os grupos do protocolo I no T90; circulação de imunocomplexos, além da interferência da supressão ou estímulo de citocinas.

Em experimentos de linfoproliferação, antígenos de excreção e secreção de *T.solium* já foram descritos como supressores da resposta imune em humanos e camundongos (ARECHAVALETA; MOLINARI; TATO, 1998; MOLINARI et al., 1990; TATO et al., 1995), sendo o mesmo registrado quando utilizados antígenos recombinantes em cultura com células de animais imunizados (TOLEDO et al., 1999).

BUENO e colaboradores (2001) confirmaram a imunossupressão observada em cultura com células mononucleares de pacientes com NC e antígenos de escólex e/ou membrana de *T. solium*, e antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps*, embora, amostras de soro dos mesmos pacientes (6 entre 8 pacientes) tivessem apresentado IgG antígeno-específica, concluindo por uma tendência ao perfil Th2, nos pacientes, classificados como tipo III e IV (cistos degenerados e/ou cistos associados com processo inflamatório; presença de cistos calcificados) de acordo

com MACHADO et al. (1990), podendo em contrapartida, a resposta Th1 ser considerada como protetora.

Imunizações com recombinante de paramiosina induziram cerca de 52,0% de redução na quantidade de cistos, com predomínio de IgG1, proliferação de esplenócitos em cultura, porém, quando realizada apenas uma semana após a última imunização (VALQUEZ-TALAVERA et al., 2001).

Aluja e colaboradores (2005) verificaram imunossupressão em cultura de células mononucleares obtidas de suínos previamente infectados e estimuladas com concanavalina, devido provavelmente à adaptação parasitária no hospedeiro. Esta supressão persistiu por cerca de quatro meses de infecção, sendo que após este período a proliferação foi recuperada. O mesmo ocorreu quando utilizado S3Pvac como mitógeno. Linfoproliferação apenas foi diferenciada do grupo controle após os mesmos quatro meses e duas imunizações utilizadas para tratamento, sendo correlacionada com a morte do parasita.

Os resultados obtidos neste trabalho não apresentaram imunossupressão com fitohemaglutinina ou conconavalina (controles positivos utilizados nestes experimentos), demonstrando que nos casos de imunossupressão esta deve estar relacionada com o perfil de antígeno e não supressão total dos linfócitos presentes.

Relatos de imunosupressão em cultura de células esplênicas de camundongos infectados e estimuladas com concanavalina foram registrados por Baig et al. (2006), sendo que o contraste ocorreu com extratos de cisteina protease, porém com redução apenas de 46,0% a 49,0% dos cisticercos.

Durante a infecção murina, outros autores analisaram que o próprio mecanismo de evasão dos cisticercos de *T. crassiceps* induzem apoptose pela via Fas/FasL, preferencialmente em células Th1 efetoras, o que resulta em sobrevivência das células Th2 e desequilíbrio Th1/Th2. Este desequilíbrio tende a favorecer o desenvolvimento dos parasitas (WANG et al., 2003). Assim, mesmo não sendo plenamente suficiente, considera-se neste trabalho que a resposta imune celular é um parâmetro importante para proteção anti-cisticercose.

2) Antígenos de baixo peso molecular podem estimular parcialmente a linfoproliferação, fundamentados nos resultados obtidos com o estímulo das células de linfonodos (tabela 9,13 e 17) e a possibilidade de produção de anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* previamente pelo grupo, que reconhecem as proteínas de baixo peso molecular (ESPINDOLA et al., 2005). Neste trabalho, sob

condições semelhantes, camundongos Balb/c foram estimulados com antígenos de alto peso, obtendo baixa quantidade de linfócitos e hibridomas não secretores (dados não mostrados) em duas tentativas de produção de anticorpos monoclonais anti-proteínas de alto peso molecular. O objetivo da produção seria a purificação de antígenos por coluna de afinidade, a fim de imunizar grupos experimentais com outras frações específicas que poderiam ter potencial protetor.

Outros autores alcançaram IE acima de 2,5 quando utilizados antígenos brutos ou purificados (BAIG et al., 2006; VALQUEZ-TALAVERA, 2001), recombinantes (GUO et al., 2004; MANOUTCHARIAN et al., 1998; SOLIS et al., 2005; TOLEDO et al., 2001; WANG et al., 2003;), peptídeos sintéticos (TOLEDO et al., 1999) ou imunizações baseadas em DNA (SOLIS et al., 2005) de *T. solium* ou *T. crassiceps*.

3) A resposta protetora deve coexistir com diferentes mecanismos, dependendo do tipo de antígeno aplicado ou concentração antigênica. Os grupos imunizados com 5 ou 10µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$ (protocolo II) apresentaram 100,0% de IP, porém, não apresentaram parâmetros semelhantes (tabela 13) de IE no T60 (mesmo sendo todos já desafiados).

4) A linfoproliferação utilizando esplenócitos e 18/14, embora com menor positividade quando comparada à cultura de linfonodos estimulados com 18/14 pode estar melhor correlacionada com os IP acima de 90,0%. Quatro dos cinco grupos pertencentes ao protocolo II com IP superiores a 90,0% apresentaram IE positivos e ainda, os cinco grupos analisados em cultura e imunizados de acordo com o protocolo I ou III que apresentaram IP inferiores a 90,0% não demonstraram IE. Assim, sugere-se que o estímulo de resposta humoral possa ser protetor nos primeiros trinta dias de infecção, porém a proteção deve ser mantida com mecanismos de resposta imune celular.

Estudos prévios verificaram predomínio CD4+, em relação a CD8+ em grupos imunizados (CRUZ-REVILLA et al., 2000; RODRIGUEZ-SOSA et al., 2004) ou presença de CD4+ e CD8+ (FRAGOSO et al., 1998; ROSAS et al., 2002). Antígeno GK1 induziu em outros ensaios, IP de 70,0%, sendo que a população de linfócitos foi predominantemente CD8+ (TOLEDO et al., 1999). Imagina-se que a variação de resposta está mais relacionada com o perfil de antígeno do que com a forma de imunização. Uma conclusão parcial a respeito dos mecanismos de resposta imune envolvida na cisticercose murina pode ser que mediadores humorais e celulares são efetivos e suficientes contra o parasita, porém, não são igualmente detectáveis em

todos os protocolos experimentais ou tempo de infecção (CRUZ-REVILLA et al., 2000). Em estudos anteriores Zepeda et al. (2010) verificou imunossupressão de células CD4+, além de CD8+ e CD19+ em células obtidas de animais infectados. Este alto nível de depleção celular pode estar relacionado com os produtos de secreção dos parasitas ou ainda estímulos insuficientes para as células CD8+ *in vitro*.

Paralelamente aos ensaios de linfoproliferação analisou-se de forma piloto (dados não mostrados) a variação entre três grupos de células de linfonodos obtidas de animais apenas infectados com *T. crassiceps*, animais supostamente saudáveis e animais imunizados com 18/14. Houve a presença de células CD3+/CD4+ entre 40,0% a 60,0% do total de linfócitos analisados, sendo os índices apresentados de forma decrescente, respectivamente, com os grupos de animais supostamente sadios, imunizados com 18/14 e infectados. Células T (CD3+) podem estar relacionadas com a indução de citocinas inflamatórias (IFN-γ e IL-2), ativação de macrófagos em tecidos próximos ao parasita, expansão de células CD8+ e células B antígeno-específicas, sendo ainda, a ativação de células CD4+ considerada um importante indicador de estímulo de células T, após imunização (CRUZ-REVILLA et al., 2000; WANG et al., 2003). Células CD3+/CD8+ foram obtidas em menos do que 30,0% dos linfócitos analisados em todas as avaliações. Análise dos receptores celulares relacionada com a proteção dos grupos necessita ser posteriormente avaliada para melhor esclarecimento dos mecanismos celulares envolvidos.

A dosagem de citocinas é considerada um importante parâmetro de polarização celular para resposta Th1 (IL-2, IFN-γ) ou Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2004). Os resultados apresentados pelos grupos nos primeiros 60 dias de estímulo foram ligeiramente voltados para o padrão Th1 (predomínio de IFN-γ – figura 11) quando analisados os sobrenadantes de cultura de linfonodos de grupos imunizados com uma dose (protocolo II) e quando analisados linfonodos ou células esplênicas de camundongos imunizados com, pelo menos, duas doses (protocolo III – figura 14). A visão geral dos resultados são semelhantes ao que ocorre naturalmente na cisticercose murina (TERRAZAS et al., 1999), provavelmente por terem grupos representados por diferentes perfis de proteção (tabela 14 e 18). Os resultados estão condizentes com o perfil de relação IgG1 e IgG2a (T60) neste período e com os resultados de linfoproliferação.

Na tentativa de correlacionar o perfil de resposta protetora, salienta-se os resultados obtidos com o grupo imunizado com três doses de 40µg de 18/14 com o auxílio de $Al(OH)_3$ (protocolo III), que apresentou 100,0% de IP. Houve no T60 concentrações acima de 100pg/mL de IFN-γ. Assim, sugere-se, como outros pesquisadores, um direcionamento para perfil Th1 para uma proteção imediata, provavelmente por estar relacionada com a destruição do parasita e com a fase de formação dos granulomas (ROBINSON et al., 1997).

A modulação eficaz para proteção anti-cisticercose pode ser variável em cada estudo, até mesmo, de acordo com o antígeno utilizado. Reduzida proteção (43,0% a 48,0%) foi verificada com plasmídeo pCMV-synVW2-1 de *T. solium*, embora tenha estimulado a secreção de IFN-γ (705pg/mL) em cultura de células esplênicas (SOLIS et al., 2005). Ou ainda no caso em que estímulo Th1 foi obtido por imunização intramuscular com DNA baseado de *T. solium*, apresentando IL-2, ao invés de IL-4, porém, proteção apenas de 73,0% em suínos. Os resultados podem ser devido ao perfil de antígeno apresentado à célula e também à reduzida resposta inflamatória, quando comparada a uma imunização proteica. (WANG et al., 2003).

Manoutcharian et al. (1998) imunizaram camundongos com DNA-*T.solium,* porém, obtiveram IP em torno de 65,0%, compatíveis com IE inferiores a 2,5 e baixas concentrações de IFN-γ (64 pg/mL). Toledo et al. (1999) verificaram aumento na produção de IFN-γ e diminuição de IL-4 em cultura de esplenócitos de camundongos imunizados com GK-1 após estímulo de GK-1 e antígenos brutos, sendo que células de animais não imunizados, apenas apresentaram aumento após estímulo com concanavalina. IFN-γ já foi citada como uma citocina importante na proteção contra outras parasitoses em camundongos (FERRU et al., 1997).

Os resultados não concordantes entre grupos (figura 11 e 14) podem estar relacionados com diferentes períodos de cultura, supressão de células coletadas e até mesmo a coleta de linfócitos não secretores para doenças parasitárias. Pesquisadores sugerem que infecções helmínticas crônicas modulam o padrão final Th2 de células CD4+, porém, representadas por perfil celular previamente sensibilizado com antígenos parasitários não relacionados (RODRIGUEZ-SOSA et al., 2002).

Quanto ás análises de HTT, não foi possível correlacionar os HTT com os IP para cisticercose murina, porém, os resultados sugerem reatividade compatível com

o perfil de adjuvante, visto que no T7 (figura 9 e 15), os resultados foram direcionados para o adjuvante PSS/DDA em relação à $Al(OH)_3$ e de acordo com os dados apresentados na figura 12, DODAB pode estimular melhor resposta celular quando comparado à PSS/DDA ou $Al(OH)_3$. Lincopan e colaboradores (2007) já relataram o mesmo padrão de resposta imune celular entre os adjuvantes utilizados.

No T60 (figura 9 e 15) grupo imunizado com $Al(OH)_3$ apresentou maior HTT quando comparado à PSS/DDA, enquanto que de acordo com a figura 12, grupos imunizados com DODAB foram considerados melhores respondedores quando comparado à grupos imunizados com o auxílio de PSS/DDA ou $Al(OH)_3$.

Sugere-se, portanto, para obter melhor resposta celular o auxílio de adjuvantes alternativos como o DODAB.

5.4- Protocolos de imunização ativa subcutânea: Análises dos índices de proteção

Diversos autores registraram baixos IP utilizando antígenos brutos (SCIUTTO et al., 1995; VALDEZ et al., 1994), entre 40,0% e 98,7% quando utilizados peptídeos sintéticos (ALUJA et al., 2005; HUERTA et al., 2001; TOLEDO et al., 1999) e entre 52,3% e 100,0% com antígenos recombinantes (CRUZ-REVILLA et al., 2000; MANOUTCHARIAN et al., 1998; ROSAS et al., 1998; TOLEDO et al., 2001) de *T. crassiceps*.

Neste trabalho, dos 19 grupos imunizados pela via subcutânea, seis grupos apresentaram 100,0% de IP (tabela 14 e 18), ou seja, não houve desenvolvimento de cisticercos após o desafio, sendo um grupo imunizados com uma dose de 18/14 (10µg) e $Al(OH)_3$, dois grupos com uma dose de 18/14 (5 e 10µg) e DODAB e três grupos imunizados com três doses de 18/14 (20, 40 ou 60µg) e $Al(OH)_3$ (protocolos II e III). Nota-se que mesmo doses baixas (5 e 10µg) de 18/14 foram consideradas eficientes nestes experimentos para o controle da cisticercose murina, quando utilizadas com auxílio de DODAB ou $Al(OH)_3$, portanto, protocolos de imunização promissores. Salienta-se ainda que mesmo com a aplicação da proteína sem o auxílio de adjuvante obteve-se IP de 51,8%.

Outros autores consideraram em seus estudos desafios apenas após, pelo menos, 30 dias da primeira dose de imunização, ainda assim, com *boosters* a cada 15 dias (CRUZ-REVILLA et al., 2000; ROSAS et al., 1998; TOLEDO et al., 1999).

O número ideal de doses antigênicas não foi estipulado com estes experimentos, visto que são dependentes da própria concentração antigênica e pode ser ainda correlacionado com o período de armazenamento do animal em cativeiro e da necessidade de duração da resposta protetora.

Sugere-se que a resposta protetora está direcionada às proteínas de baixo peso molecular e às de alto peso em torno de 67 kDa, visto que grupo imunizado com 20µg de antígeno de alto peso (dados não mostrados), sob as mesmas condições, apresentou entre 91,9% a 93,1% de IP. Valdez e colaboradores (1994) já haviam direcionado a resposta protetora à proteína de 66kDa de *T. crassiceps*, enquanto que proteínas alto peso foram relacionadas com imunossupressão (SPOLSKI et al., 2000). Assim, pelos dados relatados, imagina-se que as proteínas imunossupressoras devem ter entre 30 e 67kDa ou acima de 96kDa, presentes no antígeno bruto.

Embora os resultados sejam animadores com 18/14, pretende-se ainda analisar a viabilidade de uso do antígeno LV-total por via subcutânea devido à facilidade de obtenção, praticidade de concentração e presença de outras proteínas com potencial imunogênico.

A durabilidade da proteção é um ponto importante a ser analisado em próximos experimentos, visto que suínos criados *in house* para consumo de carne, normalmente são mantidos em cativeiro por cerca de um ano em regiões endêmicas, embora, que para animais utilizados comercialmente, este tempo tenda a ser menor, cerca de 140 dias (GOMES et al., 2007). Assim, verificar a eficácia da vacina durante mais de 12 semanas seria um desafio importante para a análise. Guo et al. (2004) acompanharam a duração da proteção de suínos imunizados com antígenos recombinantes GST-cC1. Desafios após 6, 12 e 20 semanas de imunização, apresentaram, respectivamente, 93,0%, 84,0% e 61,0% de IP, com tendência de redução de proteção, de forma rápida e gradativa, com o tempo de exposição.

Análises parciais de durabilidade sugerem que a proteção com uma dose de 18/14 (10µg) é eficiente por menos de 60 dias, visto que desafio após 30 dias resultou em IP de 70,1% a 100,0% (tabela 14) e após 60 dias, IP entre 24,9% e

38,2% (tabela 10) com o auxílio de adjuvantes. Para a continuação deste estudo, a análise de durabilidade poderia ser considerada dificultada devido ao perfil de animal experimental utilizado (senescência em curto período) e ao fato dos cisticercos serem melhor adaptáveis com os camundongos entre 9 e 12 semanas de idade (VAZ et al, 1997). Ongradi et al (2009) verificaram que na senescência, a resposta imune inata e adquirida diminuem suas funções, resultando em diminuição da habilidade do linfócito B produzir novos anticorpos, distúrbios de produção de citocinas, redução de células *natural killers* e deficiências na apresentação de antígeno, além de infecções parasitárias persistentes contribuírem para a prematura exaustão de células T e da imunovigilância.

A variação intra e inter grupos pode ser explicada dependendo de alguns pontos, como: controle da aplicação antigênica, homogeneização da suspensão, possibilidade de volume parcialmente aplicado, variação de peso ou idade dos camundongos, frequência de imunizações e características dos antígenos (RAZ, 1997). Além disto, a influência endócrina do hospedeiro pode ser considerada ainda mais importante do que a própria modulação da resposta imune (HUERTA et al., 2001).

Avaliando os perfis de adjuvantes utilizados sugere-se a aplicação de DODAB preferencialmente à PSS/DDA ou hidróxido de alumínio (tabela 14), devido provavelmente ao maior estímulo de resposta celular Th1 (figura 12), ainda mantendo a resposta imune humoral (LINCOPAN et al, 2009), ainda salientando o uso de 18/14 como antígenos de propostas vacinais.

5.5 – Protocolo de imunização ativa oral

Para análise do protocolo de imunização oral foram imunizados seis grupos entre 10 e 30µg de LV-total e entre uma e duas doses. A via de imunização pode influenciar na produção de anticorpos. Na figura 16 é possível verificar que os grupos imunizados com uma dose apenas apresentaram diferença significativa no T60 e que os grupos imunizados com duas doses não apresentaram diferença significativa quando imunizados com 10 ou 20µg, sendo diferentes quando imunizados com 20 ou 30µg. A aplicação vacinal estimulou a produção de anticorpos

a partir do T15. Outros autores relataram estímulos de resposta humoral a partir de T15 em ensaios de imunização oral anti-cisticercose (FONSECA-CORONADO et al., 2011; MANOUTCHARIAN et al., 2004), porém, com menores IR..

De acordo com outros autores, a via de imunização pode implicar na proteção e produção de anticorpos. Cruz-Revilla e colaboradores (2000) verificaram que o mesmo perfil de antígeno quando aplicado por via intradérmica induzia a produção de anticorpos, enquanto que por via intramuscular este perfil de resposta não ocorria.

A análise das subclasses de IgG dos grupos imunizados pela via oral (tabela 19) demonstrou um perfil Th1 (predomínio de IgG2a) no T30 e T60, enquanto que outros autores verificaram perfil Th2 (FONSECA-CORONADO et al., 2011). Alguns estudos sugerem que a imunização por via oral pode induzir tolerância de células T, principalmente CD4+, após administração de altas doses antigênicas ou repetidas doses com baixa concentração antigênica, via Th2, com predomínio de IL-10 e IL-4, além da supressão de IFN-γ (KAPP et al., 2010). Neste trabalho, associa-se pela análise das subclasses de IgG, polarização Th1, com ausência de tolerância, com as concentrações antigênicas utilizadas, visto que, a imunização pôde induzir índices eficientes de proteção. Ressaltando, mais uma vez a importância do perfil Th2 de início para induzir proteção. IP de 100% pôde ser obtido apenas a partir de 2 doses de 30µg de LV-total (tabela 21).

Os IR utilizando amostras de soro no T15 e T30 dos grupos imunizados por via oral foram entre 0,9 e 2,4, embora com fraca reatividade em Imunoblot, da mesma forma que registrado por outros autores (FONSECA-CORONADO et al., 2011). O reconhecimento das proteínas acima de 40kDa ocorreu apenas no T30 e de forma mais expressiva no T60 das proteínas de 14, 18, 30 e acima de 40kDa de *T. crassiceps* (tabela 20).

Os ensaios para avaliação dos IP obtidos por imunização oral foram realizados utilizando antígeno LV-total devido à complexidade antigênica. O objetivo da avaliação por via oral não foi na tentativa de uma análise prévia para suínos, mas sim, verificar a eficiência do antígeno, independente da via de administração. Devido à degradação da proteína possivelmente por esta via, preferi-se a análise com LV-total ao invés de 18/14. Leon-Cabrera e colaboradores (2009) obtiveram 33,0% a 44,0% de IP para teníase ao utilizar calreticulina de *T. solium* em ensaios de imunização por via oral. Manoutcharian e equipe (2004) apresentaram cerca de

80,0% de proteção com a utilização de phagos, enquanto que Cruz-Revilla e colaboradores (2000) e Mayta et al. (2007) apresentaram IP acima de 78,0%, respectivamente, com S3PVac baseada em peptídeos sintéticos e recombinante Tso31 de *T. solium*, mas, nenhuma equipe com 100,0% de proteção com antígeno bruto. Os IP obtidos neste trabalho pela via oral estão relacionados com o número de doses e com a concentração antigênica (tabela 21).

5.6- Protocolo de imunização passiva

Os resultados obtidos com os ensaios de imunização passiva foram direcionados, na tentativa de analisar melhor a participação dos anticorpos na resposta imune protetora. Há anos, tratamentos baseados em imunização passiva com anticorpos monoclonais são utilizados para o controle de doenças infecciosas (KELLER; STIEHM, 2000). Este perfil de tratamento pode ser utilizado inclusive de forma profilática, em casos semelhantes com as infecções ocasionadas pelo vírus *influenzae* que apresenta variação antigênica anual e, portanto, não se objetiva, mesmo em uma vacina, que a resposta protetora seja amplamente duradoura, sendo assim, o uso de anticorpos uma medida considerada (YAMAZAKI et al., 2011).

No caso da cisticercose, a técnica de imunização passiva poderia ser aplicada em áreas endêmicas como uma medida adicional no controle da parasitose, visto que a aplicação dos anticorpos torna o cisticerco com menor potencial de transmissão (GARCIA et al., 2001).

Alguns autores salientam que não há uma correlação entre a produção de imunoglobulinas com os IP no modelo vacinal de *T. crassiceps*, porém, certamente está relacionada com a proteção de *T. ovis* (ROSAS et al., 2002), incluindo até mesmo, a via de imunização passiva, visto que parturientes foram imunizadas por 20 semanas antes do parto e os cordeiros nascidos foram considerados protegidos da infecção por mais do que 18 semanas (HEATH et al., 1979).

A neutralização das proteínas de baixo peso molecular, realizada neste estudo com auxílio de anticorpos anti-ES-Tcra, representa cerca de 59,0% da perda de viabilidade dos cisticercos (tabela 22), de acordo com a observação nos testes de

bloqueio dos cisticercos, porém, apenas uma aplicação via peritoneal de anti-ES-Tcra mostrou-se ineficiente para o controle da infecção. Este resultado pode ser devido ao curto prazo da viabilidade dos anticorpos *in vivo* (YAMAZAKI et al., 2011). Paralelamente, doses contínuas de anticorpos anti-ESTcra representaram acima de 87,0% de controle para a cisticercose murina.

Garcia e colaboradores (2001) com a aplicação de anticorpos anti-GK1 apresentaram IP de 90,0% em camundongos e suínos, embora, da mesma forma que neste estudo, anticorpos inespecíficos (anti-microcistina) também representaram proteção, provavelmente devido à presença de frações Fc.

A imunização passiva aplicada neste estudo controlou parcialmente a infecção (tabela 22) com os ensaios de bloqueio e quando aplicadas doses seriadas de anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra (IP de até 90,0%), embora, as frações sejam representadas por $F(ab)_2$ e Fc, considerado desta forma, como um estímulo inespecífico devido ao resultado semelhante com anti-microcistina. Alguns autores salientam a importância específica da imunização passiva quando utilizada apenas a fração $F(ab)_2$ de IgG (FU et al., 2011; LOZANO et al., 2011), visto que a fração Fc pode ativar outros mediadores celulares. Mesmo assim, para a continuação dos estudos, a fração Fc pode ser utilizada como marcador para correlacionar a concentração de imunoglobulinas considerada efetiva e inibitória para o desenvolvimento da cisticercose murina, devido à possibilidade de comparação de leituras em citometria de fluxo (BORDIGNON et al., 2002).

Os resultados obtidos de imunização passiva não poderiam ser considerados exclusivamente relacionados com a função das imunoglobulinas, visto que o desafio foi intraperitoneal, portanto, induzidos também mecanismos inflamatórios. A neutralização antigênica com o auxílio de anticorpos monoclonais coopera com a imunidade celular baseado em fagocitose, citotoxicidade mediada por células, ativação do sistema complemento, inibição de crescimento, aderência ou formação de biofilme. Os mecanismos envolvidos podem ser considerados complexos e baseados ainda no isótipo de imunoglobulina, como IgG1 (presente nos anticorpos monoclonais utilizados), síntese de óxido nítrico e região Fc (BUISSA-FILHO et al., 2008).

Pelos resultados apresentados, antígeno bruto e purificado de *T. crassiceps* podem induzir imunidade protetora anti-cisticercose. Em estudos posteriores pretende-se avaliar a durabilidade de proteção a prazos longos (acima de três meses) e a utilização de diferentes adjuvantes de forma isolada e em adição a outros com mecanismos conhecidos, a fim de favorecer o desempenho vacinal, para possível aplicação no hospedeiro intermediário do complexo teníase – cisticercose, causado por *T. solium*, os suínos, e desta maneira, reduzir indiretamente os casos de NC humana, de alta morbidade e mortalidade.

6- CONCLUSÕES

A partir da análise dos perfis antigênicos utilizados nos protocolos de imunização ativa, os antígenos 18/14 e LV-total foram considerados imunogênicos, apresentando, desta forma, potencial para aplicação em protocolos vacinais.

Sobre a imunização ativa subcutânea:

- Este perfil de imunização foi apreciado como próspero para auxiliar no estímulo de uma resposta protetora, visto que mecanismos de resposta imune humoral e celular foram observados após aplicações antigênicas por esta via.
- Os adjuvantes foram considerados eficientes no estímulo da resposta imune humoral. PSS/DDA e $Al(OH)_3$ induziram IR semelhantes e ainda mais expressivos do que quando utilizado DODAB, porém, este último pode impulsionar a produção de anticorpos de forma mais precoce e com maior avidez. Não houve correlação dos IR com as concentrações antigênicas aplicadas e com os IP obtidos.
- O antígeno LV-total foi sugerido como imunossupressor nos ensaios de proliferação celular, provavelmente devido à presença de proteínas de alto peso molecular, enquanto que a avaliação da resposta imune celular por ensaios de proliferação de células obtidas de linfonodos e estimuladas com 18/14 refletiram os IP obtidos.
- Os adjuvantes utilizados (DODAB, PSS/DDA e $Al(OH)_3$ podem auxiliar no estímulo da resposta imune celular em protocolos vacinais, sendo de forma mais expressiva com o auxílio de DODAB quando analisados os resultados do HTT.
- A dosagem de citocinas foi considerada compatível com os resultados analisados da pesquisa de subclasses de IgG, perfil Th1 e Th2.
- Para trinta dias de proteção, a dose de 5 ou 10µg de 18/14 com o auxílio de DODAB ou $Al(OH)_3$ foi indicada, sendo que para intervalos superiores de tempo sugere-se a aplicação de duas ou mais doses, a fim de manter o estímulo protetor.
- Sugere-se a aplicação de DODAB preferencialmente à PSS/DDA ou $Al(OH)_3$, devido provavelmente ao maior estímulo de resposta celular Th1, ainda mantendo

a resposta imune humoral com avidez, ainda salientando o uso de baixas concentrações de 18/14 como antígeno de proposta vacinal.

Sobre a imunização ativa oral:

- A imunização utilizando LV-total como estímulo foi considerada protetora com concentração antigênica de 30µg, duas doses, por trinta dias, provavelmente devido à presença de proteínas de baixo peso molecular, porém, devido à dificuldade de aplicação do antígeno e aos IP sugere-se a via subcutânea para ensaios futuros.
- O perfil de resposta induzido foi Th1, porém, com mecanismo celular ainda considerado pouco expressivo, de acordo com os resultados de HTT analisados.

Sobre a imunização passiva:

- A imunização passiva foi considerada não efetiva para controle de possíveis surtos, visto ao alto número de doses necessárias, indicando-se preferencialmente a utilização de medicações.

- Os mecanismos relacionados com a resposta imune protetora foram parcialmente deduzidos, envolvendo inicialmente o estímulo de produção de IgG específica, perfil Th2, e em um segundo momento, participação da resposta imune celular, perfil Th1, relacionada com produção de linfócitos T e outras células, considerada nestes experimentos como preponderante para manter a proteção contra cisticercose murina.
- A resposta protetora deve coexistir com diferentes mecanismos, dependendo do tipo de antígeno aplicado, concentração antigênica ou ainda via de aplicação e ainda não são igualmente detectáveis em todos os protocolos experimentais devido às variáveis que foram aplicadas.
- Serão necessários novos estudos com adjuvantes alternativos a fim de manter por períodos longos estímulo celular protetor e estudo de antígenos purificados de diferentes massas moleculares a fim de descrever a condição antigênica mais pertinente a induzir uma resposta imune protetora, indicando-se inicialmente as proteínas de baixo peso.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLAN, J.C. et al. Dipstick dot ELISA for detection of *Taenia* coproantigens in humans, **Parasitology**, EUA, v.107, p.79-85, 1993.

ALLAN, J.C. et al. Fideal trial of diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by coproantigen enzyme linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., EUA, v.52, p.352-356, 1996.

ALLAN, J.C. et al. Imunodiagnostic tools for taeniais. **Acta Tropica**, Netherlands, v.87, p.87-93, 2003.

ALLAN, J.C.; CRAIG, P.S. Coproantigens in taeniais and echinoccosis. **Parasitology International**, Netherlands, v.55, p. S75-S80, 2006.

ALUJA, A.S. et al. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v.61, n.1-2, p.49-59, 1996.

ALUJA, A. S. et al. Therapeutic capacity of the synthetic peptides-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. **Vaccine**, Netherlands, v. 23, n.1, p.4062-4069, 2005.

AMARAL, A. L. et al. Manual de Boas Práticas de Produção de Suínos. **EMBRAPA**, Santa Catarina, 2006. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_k5u59t7m.pdf>. Acesso em 09 jan. 2012.

ARECHAVALETA, F.; MOLINARI, J.L.; TATO, P. A. *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. **Parasitol. Res**., Alemanha, v.84, n.2, p.117-122, 1998.

ASSANA, E. et al. Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. **Int. J. Parasitol**., Inglaterra, v.40, n.5, p.515-519, 2010.

AUTHIER, F. et al. Al(OH)3-adjuvanted vaccine-induced macrophagic myofasciitis in rats is influenced by the genetic background. **Neuromuscular Disorders**, EUA, v.16, p.347–352, 2006.

BABOS, S.; NEMETH, I. Az echinococcis szerodiagnoztikajanak kerderehez. **Magyar Allatorvosok Lapta**, Hungria, v.17, p.58-60, 1962.

BAIG, S. et al. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. **Microbes and infection**, Netherlands, v.8, p.2733-2735, 2006.

BRAGAZZA, L.M. et al. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, Brasil, v.44, n.1, p.7-12, 2002.

BOA, M.E. et al. Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v.106, p.155-164, 2002.

BORDIGNON, J. et al. Calculating rabies virus neutralizing antibodies titres by flow cytometry. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, Brasil, v.44, n.3, p.151-154, 2002.

BUENO, E. C. et al. Specific *Taenia crasiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, EUA, v.38, n.1, p.146-151, 2000.

BUENO, E.C. et al. . Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clinical and Experimental Immunology**, Inglaterra, v.126, p.304-310, 2001.

BUENO, E.C. et al. Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). **Acta Tropica**, Netherlands, v.91, n.2, p.205-213, 2004.

BUISSA-FILHO, R. et al. The monoclonal antibody against the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* mediates immune protection in infected BALB/c mice challenged intratracheally with the fungus. **Infect. Immun.,** EUA, v.76, n.7, p.3321-3328, 2008.

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

CENTRO PARA CONTROLE E PREVENÇÂO DE DOENÇAS. Disponível em: <http:www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em 03 jan.2012.

CHAVARRIA, A. et al. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. **Clin. Immunol.**, EUA, v.116, n.3, p.271-278, 2005.

CHONG, L.T. et al. Computation of electrostatic complements to proteins: a case of charge stabilized binding. **Protein Sci**., EUA, v.7, n.1, p.206-210, 1998.

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**., Brasil, v.36, supl. 1., 2000.

COUETTE, M. et al. Long-term persistence of vaccine-derived aluminum hydroxide is associated with chronic cognitive dysfunction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, EUA, v.103, p. 1571–1578, 2009.

CRUZ-REVILLA, C. et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. **J. Parasitol.,** EUA, v.86, n.1, p.67-74, 2000.

DALTON, J.P.; MULCAHY, G. Parasite vaccines – a reality?. **Veterinary Parasitology,** Netherlands, v.98, p.149-167, 2001.

DEOL, H.S. et al. The influence of gamma inulin and algammulin on the immune response in sheep to a recombinant antigen of *Taenia ovis*. **Vaccine**, Netherlands, v.13, n.5, p.429-433, 1995.

DIAZ, F. et al. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. **American Journal of Epidemiology**, EUA, v. 135, n. 8, p.875-882, 1992.

DÍAZ, M.A. et al. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. **Veterinary immunology and immunopathology**, EUA, v.93, n.1, p.81-90, 2003.

FUNARO, V. M. B. O. et al. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso.** 2ª Ed. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

EMERY, D.L.; ROTHEL, J.S.; WOOD, P.R. **Immunology and cell biology**, Inglaterra, v.68, n.2, p.127, 1990.

ESPINDOLA, N.M. et al. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticerci immune antibodies with *Taenia solium* antigens. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v.89, n.4, p.321-326, 2000.

ESPINDOLA, N.M. et al. Cysticercosis Immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticerci antigens obtained by immunoaffinity chromography. **Journal of Clinical Microbiology**, EUA, v.43, n.7, p.3178-3184, 2005.

ESPINDOLA, N.M. et al. 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. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Inglaterra, v.96, n.4, p. 361-368, 2002.

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. 114p. Dissertação (mestrado em Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

FERRU, I. et al. Analysis of the immune response elicited by a multiple antigen peptide (MAP) composed of two distinct protective antigens derived from the parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol.**, Inglaterra, v.19, n.1, p.1-11, 1997.

FLISSER, A.; LIGHTOWLERS, M.W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Brasil, v.96, n.3, p.353-356, 2001.

FLISSER, A. et al. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica,** Netherlands, v.87, n.1, p.43-51, 2003.

FLISSER, A. et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. **Infect. Immun.,** EUA, v.72, n.9, p.5292-5297, 2004.

FLISSER, A.; RODRIGUEZ-CANUL, R.; WILLINGHAM III, A.L. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. **Veterinary Parasitology,** Netherlands, v.139, p. 283-292, 2006.

FONSECA-CORONADO, S. et al. *Taenia solium*: Immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice. **Exp. Parasitol.**, EUA, v.127, p.313-317, 2011.

FRAGOSO, G. et al. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 trangenic mice. **Infect. Immun.,** EUA, v.66, n.2, p.760-764, 1998.

FRANKENBURG, S. et al. Effective immunization of mice against cutaneous leishmaniasis using an intrinsically adjuvanted synthetic lipopeptide vaccine. **Vaccine**, Netherlands, v.14, n.9, p.923-929, 1996.

FU, Y.F. et al. Generation of a neutralizing human monoclonal antibody Fab fragment to surface antigen 1 of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Infect. Immun.,** EUA, v.79, n.1, p.512-517, 2011.

GARCIA, H.H. et al. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. **J. Parasitol**, EUA, v.87, n.3, p.582-586, 2001.

GARCIA, H.H. et al. Neurocysticercosis and the global world. **J. Neurol**., Alemanha, v.249, n.8, p.1107-1108, 2002.

GARCIA, H. H. et al. Diagnosis, treatment and control of *Taenia solium* cysticercosis. **Curr Opin Infect Dis.**, EUA, v.16, n.5, p.411-419, 2003.

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

GARCIA, H.H. et al. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, EUA, v.15, n.4, p.747-756, 2002.

GARCIA, H.H. et al. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. **J. Neurol. Sci.,** Netherlands, v.262, p.153-157, 2007.

GAUCI et al. Vaccination with recombinant oncosphere antigens reduces the susceptibility of sheep to infection with *Taenia multiceps*. **Int J Parasitol**, Inglaterra, v.38, n. 8-9, p. 1041-1050, 2008.

GOMES, A. B. et al. Comparative evaluation of different immunoassays for the detection of Taenia solium cysticercosis in swine with low parasite burden. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Brasil, v.102, n.6, p.725-731, 2007.

GOMES, A. B. **Obtenção de proteína recombinante baseada em antígenos do líquido vesicular de *Taenia crassiceps*: aplicação no imunodiagnóstico da neurocisticercose.** 2011. 129p. Tese (doutorado em Farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

GONZALEZ, A. E. et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue inspection for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., EUA, v.43, p.194-199, 1990.

GONZALEZ, A.E. et al. Treatment of porcine cysticercosis with albendazole. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, EUA, v.53, p.571-574.

GONZALEZ, A.E. et al. Cisticercosis working group in Peru. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 87, p.103-109, 2003.

GONZALEZ, A.E. et al. Short report: Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., EUA, v.72, n.6, p.837-839, 2005.

GONZÁLEZ, L.M. et al. Genetic variability of the 18 kDa/HP6 protective antigen in *Taenia saginata* and *Taenia asiatica:* Implicatins for vaccine development. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Netherlands, v. 176, p.131-134, 2011.

GREENE, R. M. et al, Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. **Mol. Biochem. Parasitol**, Netherlands, v.99, p.257-261, 1999.

GUO, Y. et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. **Vaccine**, Netherlands, v.22, p.3841-3847, 2004.

GUPTA, R.K. et al. Chronic local reactions, long term immunogenicity and immunologic priming of mice and guinea pigs to tetanus toxoid encapsulated in

biodegradable polymer microspheres composed of poly lactide-co-glycolide polymers. **Vaccine**, Netherlands, v.15, p.1716-1723, 1997.

GUPTA, R.K. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. **Adv. Drug Deliv. Rev**., Netherlands, v. 32, p.155-172, 1998.

HAGAN, D.T.O. Recent developments in vaccine delivery systems. **Current drug targets**, Netherlands, v.1, p.273-286, 2001.

HANDALI, S. et al. Development and evalution of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniais and neurocysticecosis in humans. **Clin. Vaccine immunol.**, EUA, v.17, n.4, p.631-637, 2010.

HAZLETT, L.D.; HENDRICKS, R.L. Reviews for immune privilege in the year 2010: immune privilege and infection. **Ocul. Immunol. Inflamm**., Inglaterra, v.18, n.4, p.237-243, 2010.

HEATH, D.D. et al. The duration of passive protection against *Taenia ovis* larvae in lambs. **Parasitology.**, EUA, v.79, n.2, oct., p.177-182, 1979.

HELDENS, J.G.M. et al. Veterinary vaccine development from an industrial perspective. **Vet. J.**, Inglaterra, v.178, p.7-20, 2008.

HOROVITZ, A. et al. Strenght and co-operativity of contributions of surface salt bridges to protein stability. **Journal of molecular biology**, Inglaterra, v.216, n.4, p.1031-1044, 1990.

HUERTA, M. et al. Synthetic peptides vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. **Vaccine**, Netherlands, v.20, n.1-2, p.262-266, 2001.

HUISA, B. N. et al. Taeniasis and cysticercosis in housemaids working in affluent neighborhoods in Lima, Peru. **Am J Trop Med Hyg.,** EUA, v.73, n.3, p.496-500, 2005.

ISHIDA, M.M.I. et al. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, Netherlands, v.89, n.1, p.73-84, 2003.

ITO, A. et al. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg**., EUA, v.59, n.2, p.291-294, 1998.

ITO, A. et al. Neurocysticercis: clinical manifestation, neuroimaging, serology and molecular confirmation of histopathologic specimens. **Southeast asian Journal Trop. Med. Public Health**, Tailândia, v.37, n.3, p.74-81, 2006.

KAPP, K. et al. Modulation of systemic antigen-specific immune responses by oral antigen in humans. **Eur J Immunol.**, Alemanha, v.40, n.11, p.3128-3137, 2010.

KATZ, A., KRAAIJEVELD, C.A., SNIPPE, H. Synthetic lipoid compounds as vaccines. In: Stewart-Tull, D.E.S. (Ed.), The Theory and Practical antigen-specific immunostimulators for improving the efficacy of killedvirus Application of Adjuvants. **JohnWiley and Sons Ltda.**, EUA, p. 37–50, 1994.

KELLER, M.A.; STIEHM, E.R. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, EUA, v.13, n.4, p.602-614, 2000.

KRISHNAN, L. et al. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum. **Infect. Immun.,** EUA, v.68, n.1, p.54-63, 2000.

KOHN, W.D.; KAY, C.M.; HODGES, R.S. Orientation, positional, additivy, and oligomerization-state effects of interhelical ion pairs in α–helical coiled-coils. **Journal of molecular biology**, Inglaterra, v. 283, n.5, p.993-1012, 1998.

KRISHNAN, L. et al. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to convencional liposomes and alum. **Infect. Immun.,** EUA, p.54-63, 2000.

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

LARRALDE, C. et al. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium, Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) and hydatid disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** EUA, v.40, p.282-290, 1989.

LEITNER, W.W.; YING, H.; RESTIFO, N.P. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. **Vaccine**, Netherlands, v.18, p.765-777, 2000.

LEON-CABRERA et al. Standardization of experimental model of human taeniosis for oral vaccination, **Methods**, EUA, v.49, n.4, p.346-350, 2009.

LETONJA, T., HAMMERBERG, C., SCHURIG, G. Evalution os spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*. **Parasitol. Res.,** Alemanha, v.73, p. 265-270, 1987.

LIGHTOWLERS, M.W. Vaccines against animal parasites. **Vet. Parasitol.**, Netherlands, v.54, n.1-3, p.177-204, 1994.

LIGHTOWLERS, M.W. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. **Int. J. Parasitol.**, Inglaterra, v.29, p.811-817, 1999.

LIGHTOWLERS, M.W. Vaccines for prevention of cysticercosis. **Acta Tropica**, Netherlands, v.87, n.1, p.129-135, 2003.

LINCOPAN, N. et al. Cationic supported lipid bilayers for antigen presentation. **Int. J. Pharm.**, Netherlands, v.340, n.2, p.216-220, 2007.

LINCOPAN, N. et al. Novel immunoadjuvants based on cationic lipid: Preparation, characterization and activity in vivo. **Vaccine**, Netherlands, v.25-27, n.42, p.5760-5771, 2009.

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

LÓPEZ-BRIONES, S. et al CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. **Parasitol Res.,** Alemanha, v.90, n.2, p.157-163, 2003.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.,** EUA, v.193, n.1, p.265-275, 1951.

LOZANO, J.M. et al. Protection against malaria is conferred by passive transferring rabbit F(ab)(2)' antibody fragments, induced by *Plasmodium falciparum* MSP-1 site-directed designed pseudopeptide-BSA conjugates assessed in a rodent model. **Mol Immunol**, Inglaterra, v.48, n.4, p.657-669, 2011.

LUO, X. et al. Protection against Asiatic *Taenia solium* induced by a recombinant 45W-4B protein. **Clin. Vaccine immunol.**, EUA, v. 16, n. 2, p.230-232, 2009.

MACDONALD, A.S.; ARAUJO, M.I.; PEARCE, E.J. Immunology of parasitic helminth infections. **Infect. Immun.,** EUA, v.70, n.2, p. 427-433, 2002.

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

MACHADO, L.R. et al. Computed tomography in neurocysticercosis: a 10-year long evolution analysis of 100 patients with an appraisal of a new classification. **Arq Neuropsiquiatr.**, Brasil, v.48, n.4, p.414-418, 1990.

MANOUTCHARIAN, K. et al. Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. **Immunol. Lett.**, Netherlands, v.62, p.131-136, 1998.

MANOUTCHARIAN, K. et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and immunophatology**, EUA, v.99, n.1, p.11-24, 2004.

MAYTA, H. et al. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Netherlands, v.156, p.154-161, 2007.

MCNEELA, E.A.; MILLS, K. H.G. Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated Immunity. **Adv. Drug Deliv. Rev**., Netherlands, v.51, p.43-54, 2001.

MEZA, N. W. et al. Cysticercosis in chronic psychiatric inpatients from a Venezuelan community. **Am J Trop Med Hyg**., EUA, v. 73, n.3, p.504-509, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Decreto 1255 de 25 de junho de 1962.** Dispõe sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Disponível em: http://www. extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta. Acesso em: 10 jan. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria 711 de 01 de novembro de 1995.** Aprova as normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. Disponível em: http://www. extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta. Acesso em: 10 jan. 2012.

MOLINARI, J.L. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. **Ann Trop Med Parasitol**., Inglaterra, v.84, n. 3, p.205-208, 1990.

MONTESOR, A.; PALMER K. Taeniasis/cysticercosis trend worldwide and rationale for control. **Parasitology International**, Netherlands, v.55, p S301-S303, 2006.

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

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 11ª edição. Editora Atheneu, Belo Horizonte, MG. 524 p., 2000.

NICOLETTI, A. et al. Epilepsy and neurocysticercosis in rural Bolivia: a population-based survey. **Epilepsia**, EUA, v.46, n.7, p.1127-1132, 2005.

ONGRÁDI ,J. et al. Immunosenescence and vaccination of the elderly, I. Age-related immune impairment. **Acta Microbiol Immunol Hung.**, Hungria, v.56, n.3, p.199-210, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Disponível em: http://www.oie.int. Acesso em: 10 jan. 2012.

PANDEY, R.S. et al. Carbohydrate modified ultrafine ceramic nanoparticles for allergen immunotherapy. **Int. Immunopharmacol.**, Netherlands, pronto para impressão, 2011.

PARDINI, A.X. et al. Cysticerci antigens in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology,** EUA, v.39, n.9, p.3368-3372, 2001.

PARDINI, A.X. et al. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*T. solium*). **Clin. Diagn. Lab. Immunol**, EUA, v.9, p.190-193, 2002.

PAWLOWSKI, Z. S. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis. **Parasitology International**, Netherlands, v.55, p.S105-S109, 2006.

PENICHE-CARDENÃ et al. Chemotherapy of porcine cysticercosis with albendazole sulphoxide. **Veterinary Parasitology**, Netherlands, v.108, p. 63-73, 2002.

PERALTA, R. H. et al. *Taenia crassiceps* cysticerci: Characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Exp. Parasitol.**, EUA, v.124, p.295-300, 2009.

PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **Int. J. Pharm.**, Netherlands, v. 364, p.272-280, 2008.

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

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J.C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, Inglaterra, v.84, p. 488-496, 2004.

PHIRI, I.K. et al. The prevalence of porcine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v.88, p.127-180, 2000.

PHIRI, I.L. et al. The prevalence of porcine cysticercosis in Eastern an Southern provinces of Zambia. **Veterinary parasitology**, Netherlands, v.108, p. 31-39, 2002.

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

RAJPUT, Z.I. et al. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. **Journal of Zheijang University. Science**, China, v.8, n.3, p. 153-161, 2007.

RAMOS JUNIOR, A. N. et al. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em um município do estado do Piauí, região nordeste do Brasi. **Cad. Saude Publica**, Brasil, v.20, n.6, p.1545-1555, 2004.

RAZ, E. Introduction: gene vaccination, current concepts and future directions. **Springer Semin Immunopathol**, Alemanha, v.19, n.2, p.131-137, 1997.

RESTREPO, B. I. et al. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. **Inter. J. Parasitol**., EUA, v.30, n.6, p.689-696, 2000.

RESTREPO, B.I. et al. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. **Infect. Immun.,** EUA, v.69, n.7, p.4554-4560, 2001.

RIMANIOL A.; GRAS, G.; CLAYETTE P. *In vitro* interactions between macrophages and aluminum-containing adjuvants. **Vaccine,** Netherlands, v.25, p.6784-6792, 2007.

ROBINSON, P. et al. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. **Infect. Immun.,** EUA, v.65, n.7, p.2925-2931, 1997.

RODRÍGUEZ-SOSA, M. et al. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. **Infect. Immun.,** EUA, v.70, n 7, p.3656-3664, 2002.

RODRÍGUEZ-SOSA, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infect. Immun.,** EUA, v.71, n.3, p.1247-1254, 2003.

RODRÍGUEZ-SOSA, M. et al. A STAT4-Dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. **Infect. Immun.,** EUA, v.72, n.8, p.4552-4560, 2004.

ROSAS, G. et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA Immunization. **The journal of Parasitology,** EUA, v.84, n.3, p.516-523, 1998.

ROSAS, G. et al. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Tania saginata* tegument antigen. **Microbes and Infection**, Netherlands, v.4, p.1417-1426, 2002.

SANCHEZ, Y. et al. Humoral and cellular immunity to hepatitis B virus-derived antigens: Comparative activity of Freund complete adjuvant, alum, and liposomes. **Infect. Immun.,** EUA, v.30, n.3, p. 728-733, 1980.

SARTI, E. La teniosis y cisticercosis en Mexico. **Rev. Salud Pub. Mex**, Mexico, v.39, p.225-231, 1997.

SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta Tropica**, Netherlands, v. 87, p.137-143, 2003.

SCHANTZ, P. M. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. **N Engl J Med**., EUA, v.327, n. 10, p.692-695, 1992.

SCHANTZ, P.M. et al. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bull. Pan. Am. Health Organ.,** EUA, v.27, n.4, p.397-402.1993.

SCHELLEKENS, M. et al. Hanbury Brown Twiss effect for ultracold quantum gases. **Science**, EUA, v.310, n.5748, p.648-651, 2005.

SCHIRMBECK, R. et al. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. **J. Virol**., EUA, v.69, n.10, p.5929-5934, 1995.

SCHIRMBECK, R.; REIMANN, J. Modulation of gene-gun-mediated Th2 immunity to hepatitis B surface antigen by bacterial CpG motifs or IL-12. **Intervirology**, Suíça, v.44, n.2-3, p.115-123, .2001.

SCIUTTO, E. et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. **Parasite immunol.**, Inglaterra, v.12, p.687-696, 1990.

SCIUTTO, E. et al. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. **Parasitol Res.**, Alemanha, v.77, n.3, p.243-246, 1991.
SCIUTTO, E. et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. **Veterinary Parasitology,** Netherlands, v.60, p.53-67, 1995.

SCIUTTO, E. et al. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. **Infect. Immun.,** EUA, v. 63, p.2277-2281, 1995.

SCIUTTO, E. et al. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. **Archives of Medical Research**, EUA, v.33, p.371-378, 2002.

SCIUTTO, E. et al. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. **Vaccine**, Netherlands, v.25, n.8, p.1368-1378, 2007.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac. **Parasite Immunol.**, Inglaterra, v.33, p.79-80, 2011.

SEGURA-VELÁSQUEZ, R. et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. **Vaccine**, Netherlands, v.24, p1073-1080, 2006.

SINGHI, P.; SINGHI, S. Neurocysticercosis in children. **Indian J. Pediatr.**, India, v.76, p.537-545, 2009.

SILVA-VERGARA, M.L. et al. The epidemiological aspects of taeniasis-cysticercosis in an endemic area of Lagamar, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Trop. S.Paulo**, Brasil, v.28, n.4, p.345-349, 1995.

SINHA, S.; SHARMA, B.S. Neurocysticercosis: a review of current status and management. **Journal of Clinical Neuroscience**, Escócia, v.16, p.867-878, 2009.

SMITH, R.E. et al. Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. **J. Immunol**., EUA, v.162, n.9, p. 5536-5546, 1999.

SOARES, K. A. et al., Imunodiagnóstico da cisticercose em suíno experimentalmente infectado com ovos de *Taenia solium,* utilizando antígenos de escólex de *Cysticercus cellulosae*. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.,** Brasil, v.58, n.1, p.15-20, 2006

SOLIS, C.F. et al. Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. **Infect. Immun.,** EUA, v. 73, n.3, p.1895-1897, 2005.

SONG, E.K.; KIM, I.H.; LEE, S.O. Unusual manifestations of *Taenia solium* infestation. **Journal of Gastroenterology**, Japão, v.39, p. 288-291, 2004.

SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. **Archives of Internal Medicine**, EUA, v.145, p.442-p.445, 1985.

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.**, Brasil, v. 51, n.1, p. 16-20, mar., 1993.

SPOLSKI, R. J.; et al. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. **Parasite Immunol.**, Inglaterra, v.22, p. 297-305, 2000.

SUN, J. et al. Cell cycle block in anergic T cells during tolerance induction. **Cell. Immunol.**, EUA, v.225, n.1, p.33-41, 2003.

TATO, P. et al. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. **Parasitol. Res**., Alemanha, v.81, n.3, p.181-187, 1995.

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

TERRAZAS, L.I. et al. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). **J. Parasitol,** EUA, v.84, n.1, p.74-81, 1998.

TERRAZAS, L. I. et al. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. **Parasitol. Res.**, Alemanha, v.85, n.2, p.135-141, 1999.

TOENJES, S.A.; KUHN, R.E. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. **Parasitol. Res.**, Alemanha, v.89, n.5, p.407-413, 2003.

TOLEDO, A. et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. **Infect. Immun.,** EUA, v.67, n.5, p.2522-2530, 1999.

TOLEDO, A. et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cisticercosis along with a prominent T1 response. **Infect. Immun.,** EUA, v. 69, n. 3, p.1766-1773, 2001.

TREJO, V. et al. What is the significance of the presence of MHC molecules on the surface of parasites in human neurocysticercosis? **J. Immunogenet**., Inglaterra, v.16, n.6, p.427-436, 1989.

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*). **The Journal infectious disease***,* EUA, v.159, n.1, p.50-59, 1989.

VALDEZ, F. et al. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. **The Journal of Parasitology**, EUA, v.80, n.6, p. 931-936, 1994.

VÁLQUEZ-TALAVERA, J. et al. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. **Infect. Immun.,** EUA, v.69, n.9, p. 5412-5416, 2001.

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. et al. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **Am J Trop Med Hyg,** EUA, v.57, p.354-357, 1997.

VAZ, A.J.; TAKEI, K.; BUENO, E.C. **Imunoensaios: Fundamentos e aplicações**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 372 p., 2007.

YAMASAKI, T. et al. Passive immune-prophylaxis against *Influenzae* virus infection by the
expression of neutralizing of anti-hemagglutinin monoclonal antibodies from plasmids. **Jpn. J. Infect. Dis**., Japão, v.64, p.40-49, 2011.

WANDRA, T. et al. High prevalence of *Taenia saginata* taeniasis and status of *Taenia solium* cysticercosis in Bali, Indonesia, 2002-2004. **Trans R Soc Trop Med Hyg**., Inglaterra, v.100, n.4, p.346-353, 2005.

WANG, Q. et al. Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia cysticercosis.* **Vaccine**, Netherlands, v.21, n.15, p.1672-1680, 2003.

WEERATNA, L. et al. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. **Vaccine**, Netherlands, v.18, p.1755-1762, 2000.

WHO, 1983. **Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis.** Gemmell, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E.J.L., Larralde, C., Nelson, G.S., Rosicky, B. (Eds.). WHOVPH/83.49. World Health Organization, Geneva.

ZEPEDA et al. Decrease of peritoneal inflammatory CD4(+), CD8(+), CD19(+) lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. **Parasitol Res**., Alemanha, v.107, n.55, p. 1129-1135, 2010.

8- ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/85/2011

São Paulo, 06 de setembro de 2011.

Ilmo(a). Sr(a)
Cristiane Rocha de Farias
Orientador: Profa. Dra. Adelaide José Vaz
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 06 de setembro de 2011, apreciou o projeto intitulado "**Avaliação da imunidade protetora contra cisticercose murina induzida com antígenos brutos e purificados de 'Taenia crassiceps'**" (Protocolo CEUA nº 335) e resolveu solicitar o que segue:

a) Ajustar a idade dos animais, pois há divergência entre o projeto e o Formulário de Registro – FR;
b) Verificar o peso dos animais. Consultar a curva de peso;
c) Corrigir o item 14a do FR. O local do experimento ainda não está credenciado pela CEUA;
d) Verificar o método de eutanásia, o deslocamento cervical só poderá ser realizado sob anestesia, caso haja necessidade deverá ser justificado;

Aguardamos pronunciamento de Vossa Senhoria no prazo de 60 dias, o não atendimento das solicitações acima, levará ao arquivamento do processo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 - Fax (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br