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

Obtenção *ex vivo* de antígenos de
excreção e secreção de cisticercos
de *Taenia crassiceps*

Rosa Palmira Jácomo Goebbels

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2008

Rosa Palmira Jacobo Goebbels

**Obtenção *ex vivo* de antígenos de
excreção e secreção de cisticercos
de *Taenia crassiceps***

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

Área de Concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Profª Associada Adelaide José Vaz

São Paulo
2008

19024

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013294

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Goebbels, Rosa Palmira Jacobo

G593o Obtenção *ex-vivo* de antígenos de excreção e secreção de
cisticercos de *Taenia crassiceps* / Rosa Palmira Jacobo
Goebbels. -- São Paulo, 2007.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Vaz, Adelaide José

I. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Doenças parasitárias
I. T. II. Vaz, Adelaide José, orientador.

616.0756-9 CDD

O que é mais difícil não é escrever muito;
é dizer tudo, escrevendo pouco.
Júlio Dantas

A **Deus** por ter me dado os pais que ainda tenho, **Cayetano** e **Rosa**, a meus filhos **Natalie** e **Alexandre**, e meu marido **Martin**, que são a minha grande fortaleza.

A **Adelaide**, pela felicidade que me trouxe quando me aceitou como orientanda.
Agora que concluí este trabalho, posso plenamente agradecer pela orientação e por estar sempre presente.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Profa. Dra. Adelaide José Vaz**, pela orientação, meu eterno agradecimento, obrigada;

A Banca do Exame Geral de Qualificação, **Profa. Dra. Julia Maria Martins de Souza Felipe** e ao **Prof. Dr. Luis dos Ramos Machado** pelas sugestões pertinentes, colaborando para o engrandecimento desse trabalho;

Aos **Profs. Drs. José Antônio Livramento, Luis dos Ramos Machado e Osvaldo Massaiti Takayanagui** por compartilhar as amostras humanas de pacientes com neurocisticercose com o Laboratório de Imunologia Clínica/USP, tornando possível a realização desse trabalho;

Ao **Laboratório de Análises Clínicas (LAC)** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP por compartilhar as amostras de soros de indivíduos supostamente saudáveis com o Laboratório de Imunologia Clínica/USP;

À **Profa. Dra. Kioko Takei**, pela compreensão, carinho de mãe e avó, amizade, simplicidade, delicadeza e harmonia;

Ao **Dr. Edward José de Oliveira**, um exemplo de perseverança e por compartilhar as amostras de soros humanos de pacientes com esquistossomose;

À **Dra. Guita Rubinsky Elefant** do Instituto de Medicina Tropical por compartilhar as amostras de pacientes com toxocaríase;

À **Dra. Eufrosina Setsu Umezawa** do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo por compartilhar as amostras de pacientes com Chagas;

À **Dra. Fátima Tiecher** do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre, Rio Grande do Sul), por compartilhar as amostras de pacientes com hidatidose;

Aos **amigos do Laboratório de Imunologia Clínica da FCF/USP**: Alberto, Andréia Cristiane, Edward, Elói, Fabyana dos Anjos e Noeli. Meu agradecimento e admiração pelo apoio, amizade, carinho e companheirismo recebidos e pela colaboração na realização desse trabalho;

A **Fabiana Erica**, pela amizade ímpar e sincera, pelo estímulo nessa caminhada;

Aos funcionários da secretaria de graduação e pós-graduação da FCF/USP,
pela atenção;

Aos funcionários: Dorlei, Carmen, Renata, Maurício pela atenção e carinho;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

RESUMO

Goebbels, R.P.J. **Obtenção ex vivo de antígenos de excreção e secreção de cisticercos de *Taenia crassiceps***. São Paulo, 2007. 75p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

Larvas de cisticercos de *Taenia crassiceps* foram deixadas em repouso em TRIS 9mM pH 7,2 com 1mM EDTA até 180 minutos, os sobrenadantes coletados e processados nos 30, 60, 120 e 180 minutos, dando origem aos antígenos de excreção e secreção (ES 30; ES 60; ES 120 e ES 180). A caracterização do antígeno de excreção e secreção de larvas de *Taenia crassiceps* foi feito por SDS-PAGE e imunoblot utilizando anticorpos monoclonais (AcMos) anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* e anticorpos humanos. Os resultados mostraram que o rendimento do antígeno ES foi menor nos primeiros 30 minutos (0,4 µg) por larva quando comparado os demais ES (ES 60: 2,4 µg; ES 120: 2,9 µg; ES 180: 2,5 µg). O SDS-PAGE confirmou que no ES 30 há menos proteínas. No imunoblot, o ES 180 mostrou que 6 AcMos (anti-LV-Tcra; anti-ES-Tcra; anti-LV-Tso: A3; anti-T-Tso: B4, B11 e A6) reconheceram apenas as frações 18- e 14-kDa do antígeno ES 180. Os AcMos anti-E-Tso (B8) e anti-LV-Tso (B6) não reconheceram frações do antígeno ES 180. Anticorpos presentes em amostras humanas de pacientes com NC reconheceram as frações protéicas entre 94- a 30-kDa e as de 18- e 14-kDa. Utilizando antígeno ES 180 e amostras de soros de pacientes supostamente saudáveis (GC), foram identificadas proteínas acima de 30-kDa e somente uma amostra reconheceu a de 16- kDa, anômala em relação ao perfil 18- e 14-kDa. As amostras de soro de pacientes com outras parasitoses mostraram reatividade com frações $\geq$ de 30-kDa do ES 180 e o maior índice de reatividade foi com a proteína 71-KDa. Um total de 77%; 70%; 60% e 70% das amostras de pacientes com toxocaríase, esquistossomose mansônica, hidatidose e Chagas, respectivamente, reconheceram a fração 71-kDa do ES 180. O antígeno ES pode contribuir com futuros estudos abordando a complexa relação parasito hospedeiro na cisticercose e na produção de vacinas para o uso em suínos.

Palavras-chave: Antígeno de excreção e secreção. *Taenia crassiceps*. Anticorpos. Neurocisticercose.

ABSTRACT

Goebbels, R.P.J. **The obtaining of *ex vivo* excretion-secretion antigen of *Taenia crassiceps cysticercus*.** 2007. 75 pgs. Thesis for Master degree. Pharmaceutical Science College of USP - University of São Paulo.

Cysticercus Larvae of *Taenia crassiceps* were maintained in TRIS 9mM pH 7,2 with 1mM EDTA for 180 minutes; the supernatant was collected and processed at 30; 60; 120 and 180 minutes, originating excretion-secretion antigens (ES 30; ES 60; ES 120 and ES 180). The characterization of the ES antigen was conducted through SDS-PAGE and immunoblot using anti-*T. crassiceps* and anti-*T. solium* monoclonal antibodies (AcMos) and human antibodies. The results showed that the production of ES antigen was lower in the first 30 min. (0,4 µg) compared with the others (ES 60: 2,4 µg; ES 120: 2,9 µg; ES 180: 2,5 µg). The SDS-PAGE confirmed that ES 30 presented less protein. By immunoblot, 6 AcMos (anti-LV-Tcra; anti-ES-Tcra; anti-LV-Tso: A3; anti-T-Tso: B4, B11 and A6) have recognized only the 18- and 14-kDa fractions of the ES 180. The anti-E-Tso (B8) and the anti-LV-Tso (B6) AcMos did not recognize any fractions. Antibodies from human samples NC recognized the proteins from 94- to 30-kDa and from 18- and 14-kDa. Using serum samples of apparently healthy individuals (GC), the ES 180 antigen showed proteins > 30-kDa and one sample recognized the 16-kDa fraction, anomalous when compared to the 18- and 14-kDa fractions. The serum samples of subjects with other parasitoses showed reactivity ≥ 30-kDa, more frequently with 71-KDa protein. A total of 77%; 70%; 60% and 70% of the samples from subjects presenting toxocariasis, esquistossomose mansônica, hidatidose and Chagas disease, respectively, recognized the 71-kDa fraction of ES 180. The ES antigen may contribute to further studies on the complex cysticercosis parasite/host relation as well as for the production of vaccines for swine.

Key words: Excretion-secretion antigen. *Taenia crassiceps*. Antibodies. Neurocysticercosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	SDS-PAGE (7-20%) dos antígenos ES. (P) Padrão de baixo peso molecular; ES 180; ES 30; ES 60; ES 120 e LV-Tcra, aplicados 10 ug/mm....	42
Figura 2 -	SDS-PAGE (7-20%) do ES até 180 minutos. P (padrão de baixo peso); ES 0-30 min; ES 30-60 min; ES 60-120 min; ES 120-180 min, aplicados 10 ug/mm.....	43
FIGURA 3 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) do antígeno ES 180 com AcMos: (1) Anti-LV-Tcra, (2) Anti-ES-Tcra; Anti-LV-Tso: (3) B6, (4) A3; Anti-T-Tso: (5) B4, (6) B11, (7) A6 e Anti-E-Tso: (8) B8, utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm)....	45
FIGURA 4 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com algumas amostras de soros NC (a) e GC (b). Controle do Conjugado (B), Controle Negativo (C ⁻) e Controle Positivo (C ⁺).....	46
FIGURA 5 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com algumas amostras de LCR-NC. Controle do Conjugado (B) e Controle Positivo (C ⁺).....	47
FIGURA 6 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com algumas amostras LCR-GC. Controle do Conjugado (B) e Controle Positivo (C ⁺).....	47
FIGURA 7 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com soros de pacientes com esquistossomose mansônica (1-10); soros de pacientes com toxocaríase (11- 20); B (Controle do Conjugado); C ⁺ (controle positivo).....	48
FIGURA 8 -	IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com soros de pacientes com Hidatidose (1-10) e Chagas (11-18); B (Controle do Conjugado); C ⁺ (controle positivo); C ⁻ (controle negativo).....	49

FIGURA 9 -

Frequência de reatividade do antígeno ES 180
no IB com amostras de NC (36-soros e 18-LCR),
GC (28-soros e 28-LCR) e 38 amostras OP.....

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-T-so obtidos, suas reatividades por ELISA e especificidade por imunoblot utilizando antígenos LV-Tcra e <i>T. solium</i>	37
TABELA 2 -	Concentração protéica e rendimento do extrato antigênico ES.....	41
TABELA 3 -	Anticorpos Monoclonais anti-Tcra e anti-Tso obtidos e suas especificidades por imunoblot utilizando antígenos LV-Tcra e ES 180.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ac	Anticorpo
AcMos	Anticorpos monoclonais
AcMo anti-ES-Tcra	Anticorpos Monoclonais anti-antígeno de excreção e secreção de <i>Taenia crassiceps</i>
AcMo anti-LV-Tcra	Anticorpos Monoclonais anti-antígeno líquido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>
AcMos anti-LV-Tso	Anticorpos Monoclonais anti-antígeno líquido vesicular de <i>Taenia solium</i>
AcMos anti-T-Tso	Anticorpos Monoclonais anti-antígeno total de <i>Taenia solium</i>
AcMo anti-E-Tso	Anticorpo Monoclonal anti-de escolex de <i>Taenia solium</i>
Ag	Antígeno
Anti-ES-Tcra	Anticorpos anti-antígeno de excreção e secreção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
Anti- <i>T. crassiceps</i> / Anti-Tcra	Anticorpos anti- <i>Taenia crassiceps</i>
C ⁺	Amostra controle positivo
C ⁻	Amostra controle negativo
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ES-Tcra	Antígeno de excreção e secreção de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>
GC	Grupo Controle
IB	Imunoblot

IR	Índice de Reatividade
LV-Tcra	Antígeno de líquido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>
LCR	Líquido Cefalorraquiano
NBT/BCIP	Nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
NC	Neurocisticercose
OP	Outras parasitoses
ORF	Ontary Research Foundation
PBS	Tampão fosfato salina (Na_2HPO_4 0,0075 M, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2)
PBS-T	PBS contendo 0,05% de Tween 20
PFHM	Protein-free hybridoma medium
RM	Ressonância Magnética
SDS-PAGE	Eletroforese em gel poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
TC	Tomografia Computadorizada
Tso / <i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
18/14-Tcra	Proteína 18/14 kDa obtida por imunoafinidade com anticorpos monoclonais a partir do antígeno LV-Tcra

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	PARASITOS.....	33
3.1.1	<i>Taenia crassiceps</i>	33
3.2	EXTRATOS ANTIGÊNICOS.....	33
3.2.1	OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE <i>T. crassiceps</i>	33
3.2.2	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS ES EM DIFERENTES TEMPOS....	34
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO ES.....	34
3.3.1	DOSAGEM PROTÉICA E RENDIMENTO DOS ANTÍGENOS ES.....	35
3.3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS POR SDS-PAGE.....	35
3.4	AMOSTRAS UTILIZADAS.....	36
3.4.1	ANTICORPOS MONOCLONAIS anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso.....	36
3.4.2	SOROS E LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO (LCR) DE HUMANOS..	37
3.5	REATIVIDADE DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DO ANTÍGENO ES FRENTE AOS AcMos anti- <i>T. crassiceps</i> E anti- <i>T. solium</i> E ÀS AMOSTRAS HUMANAS.....	38
4	RESULTADOS.....	41
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO ES.....	41

4.1.1	RENDIMENTO PROTÉICO DOS ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO/ SECREÇÃO DE <i>Taenia crassiceps</i> (ES).....	41
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS ES 30, ES 60, ES 120 E ES 180 POR SDS-PAGE.....	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS ES 0-30, ES 30-60, ES 60- 120 E ES 120-180.....	43
4.4	REATIVIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS anti- <i>T.</i> <i>crassiceps</i> E anti- <i>T. solium</i> COM O ANTÍGENO ES 180.....	44
4.5	PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES COM NC E GC.....	46
4.6	PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM NC E GC.....	47
4.7	PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES COM OUTRAS PARASITOSE.....	48
4.8	PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 0-30; 30-60; 60-120 E 120-180 MINUTOS COM AcMOS anti- <i>T. crassiceps</i> E anti- <i>T.</i> <i>solium</i> E AMOSTRAS HUMANAS.....	50
5	DISCUSSÃO.....	52
6	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

ANEXOS.....	72
-------------	----

1 INTRODUÇÃO

O complexo **Teníase-Cisticercose** continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade em humanos não somente em países subdesenvolvidos como também em países industrializados, particularmente em áreas rurais ou dentro de grupos imigrantes de áreas endêmicas, levando a impactos sociais e econômicos significativos para a Saúde Pública. Essas infecções são decorrentes de saneamento básico deficiente, carência de educação sanitária e falta de inspeção em carnes suínas (RAETHER; HÄNEL, 2003; RAMOS JUNIOR et al., 2004).

Esse complexo compreende o parasitismo pelas formas adultas e larvárias da *Taenia solium* (*T. solium*) em seus hospedeiros (LINNAEUS, 1758). A teníase é causada pelo parasitismo da forma adulta do cestóide *Taenia solium* no homem, hospedeiro definitivo e único responsável pela manutenção da doença (VAZ; LIVRAMENTO, 1996). Os suínos, hospedeiros intermediários, albergam a forma larvária conhecida como cisticerco, desenvolvendo a cisticercose (NASH; NEVA, 1984 revisto por GONZALEZ et al., 2003).

O ser humano com teníase passa a eliminar ovos ou até mesmo proglotes inteiras nas fezes. O suíno, ingerindo ovos viáveis do parasito, irá propiciar condições ideais para que o embrião hexacanto ou oncosfera se desenvolva em seus tecidos até a forma larvária da *T. solium*. Quando os seres humanos ingerem carne suína mal cozida contaminada com cisticercos de *T. solium*, desenvolve a forma adulta no intestino delgado, doença conhecida como teníase (REY, 2001). Acidentalmente, o homem adquire a cisticercose pela contaminação oral com os ovos de *T. solium* excretados nas fezes de indivíduos com a forma adulta do parasito no trato intestinal. A larva migra pelo organismo, via circulação sanguínea, e invade os músculos esqueléticos, tecidos subcutâneos, globo ocular ou sistema nervoso

central (SNC), causando a neurocisticercose (NC) (VAZ; LIVRAMENTO, 2001; GARCIA et al., 2003).

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

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

A manifestação ou não de sintomas é resultante da interação parasito-hospedeiro e também da intensidade na resposta inflamatória do hospedeiro (AGAPEJEV, 2003). Esses sintomas podem se apresentar no decurso de dias, semanas, meses ou anos após a infecção, dependendo da localização, tamanho e do número dos cisticercos viáveis ou calcificados presentes (NASH, 2003), da resposta imunológica do hospedeiro (RAHALKAR, 2000), além de variáveis culturais, nutricionais e genéticas, tanto do hospedeiro quanto do parasito (AGAPEJEV, 2003).

Assim, o polimorfismo clínico demonstrado pelos pacientes com NC é resultado de uma resposta imune que é imprevisível e individual, variando desde

completa tolerância até uma resposta intensa (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998).

As apresentações clínicas mais freqüentes são epilepsias, quadros psíquicos e demenciais e hipertensão intracraniana, a qual é responsável pela elevada letalidade (MACHADO; PIALARISSI; VAZ, 1988; AGAPEJEV, 2003). Ocorrem também, com freqüência, dores de cabeça súbitas, tonturas, vômitos, variações de pulsação e de respiração (NEVES, 2005).

A cisticercose é uma doença de distribuição universal, freqüente em países da América Latina, África e Ásia (SILVA-VERGARA et al., 1995). Nos países desenvolvidos, como o Japão e o Canadá a doença não é freqüente (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001). No entanto, aqueles países que recebem grande número de imigrantes, como os Estados Unidos, devem incluir em seus programas de saúde, as parasitoses trazidas por viajantes a negócios ou turistas provindos de regiões endêmicas (SCHANTZ et al., 1993).

Ao comparar a porcentagem de publicações sobre NC, em cada estado brasileiro, a participação que a população desses estados representa em relação à população nacional, segundo o Censo de 2000, verifica-se que, embora subestimada, a prevalência da NC, em ordem decrescente, é a seguinte: Distrito Federal, São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, estados que têm preocupação sanitária. A pior representação em ordem decrescente, encontra-se nos estados do Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Maranhão, Pará, Ceará e Rio de Janeiro.

Em hospitais gerais, a média da freqüência de pacientes com NC é de 1,13%, menor em São Paulo (0,19%) e maior no Paraná (4,8%) (AGAPEJEV, 2003).

A teníase-cisticercose não é uma doença de notificação compulsória, o que torna difícil o desenvolvimento de um estudo mais apurado de sua prevalência no território nacional. Além disso, os casos suspeitos de NC, por necessitarem de procedimentos diagnósticos e terapêuticos de maior complexidade, em geral são referenciados para serviços de saúde em grandes centros urbanos o que pode resultar na perda da procedência desses pacientes (SILVA-VERGARA et al., 1995) e, talvez, erroneamente, a região urbana ser considerada como aquela com maior prevalência das formas mais graves da NC (AGAPEJEV, 2003).

A cidade de Ribeirão Preto (SP) foi a pioneira na notificação da cisticercose. Segundo Takayanagui e Leite (2001), a prevalência de NC entre 1992-1999 foi de 74 casos/100.000 habitantes, sendo que 21% dos infectados apresentavam a forma ativa da doença, fato que apontava para a necessidade de medidas imediatas de prevenção.

A NC ocorre predominantemente entre 21 a 40 anos de idade, com maior frequência em pacientes do sexo masculino, porém, as manifestações mais graves são observadas nos pacientes do sexo feminino (AGAPEJEV, 2003). Há estudos que relatam maior número de casos de NC em mulheres jovens, indicando uma possível influência hormonal no desenvolvimento ou na suscetibilidade à doença (PFUETZEREITER; ÁVILA-PIRES, 1999).

De uma forma geral, enquanto o parasito está vivo, observa-se pouca ou nenhuma resposta inflamatória local, ocorrendo uma imunotolerância do hospedeiro aos cisticercos presentes. Considerável resposta imunológica ocorre quando os parasitos iniciam a sua degeneração: a formação de um granuloma é estimulada pela resposta inflamatória do hospedeiro no tecido atingido, resultando em um edema. Em seguida, ocorre liberação maciça de antígenos, produção de grande

quantidade de anticorpos, formação de imunocomplexos e exacerbação do processo inflamatório. Quando os cisticercos estão íntegros, podem ser vistos nas lesões, inclusive com a presença do escólex (RAHALKAR, 2000).

O tratamento dos pacientes com NC geralmente é individualizado e, de acordo com os sintomas emprega-se, antiepiléticos, analgésicos, corticosteróides e/ou intervenção cirúrgica.

O alto custo das hospitalizações, que geralmente ocorrem por 1-254 dias/ano (GARCIA; DEL BRUTTO, 2000), e do tratamento, sustenta a necessidade de diagnóstico precoce com exames laboratoriais de alta sensibilidade.

Devido às graves manifestações clínicas, principalmente decorrentes da neurocisticercose, a implantação de medidas profiláticas torna-se necessária, especialmente nos países em desenvolvimento, quais sejam: efetivo saneamento básico, aquisição de hábitos de higiene, controle da água consumida, e rigorosa inspeção da carne suína, além do diagnóstico e tratamento precoces da teníase, para interromper a continuidade do ciclo pela cisticercose (GARCIA et al., 2002).

Adicionalmente às medidas profiláticas, algumas alternativas de controle dos casos de teníase e cisticercose foram propostas por outros autores, como: educação sanitária em escolas, para a compreensão da relação entre suínos contaminados e casos de NC; desenvolvimento de vacinas e tratamento em massa de suínos e humanos. Nesse último caso, aspectos importantes podem ser negligenciados, como: as re-infecções e a contaminação remanescente do solo, que levariam anos para a estabilidade (GONZALEZ et al., 2003). Esses aspectos ocorrem porque os ovos apresentam uma casca de natureza quitinosa calcárea que pode determinar a viabilidade do embrião por até dois anos em ambiente com relativa umidade (REY, 1991).

O complexo teníase-cisticercose desapareceu em muitos países europeus há cerca de um século, graças ao desenvolvimento de sistemas de saneamento básico e de programas de prevenção de doenças parasitárias, além da implementação de medidas de controle na inspeção das carcaças dos suínos (revisto por CARPIO, 2002; revisto por FLISSER et al., 2003).

Estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos da NC contribuem para a compreensão da magnitude e distribuição da cisticercose humana. A correlação da sintomatologia com os parâmetros sorológicos e neurológicos juntamente com os dados epidemiológicos é de grande valia, uma vez que pode contribuir para realização de um diagnóstico rápido, melhorias nas medidas profiláticas e de controle e tratamento precoce dos pacientes.

DIAGNÓSTICO

Como os sinais e sintomas não são específicos da doença, a realização do diagnóstico da NC é auxiliada pela análise do líquido cefalorraquiano (LCR) e por exames de imagem como a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (RM), que possibilitam a visualização dos parasitos bem como seu estágio evolutivo. Esses exames também são utilizados no acompanhamento da evolução da doença (LIVRAMENTO; MACHADO; SPINA-FRANÇA, 1993).

Molinari et al. (2002) demonstraram que a classificação da NC pode ser realizada de acordo com o estágio biológico, morfologia do cisticerco e resposta inflamatória do hospedeiro. Com o emprego da TC e da RM, a NC foi classificada em forma ativa (com o cisticerco ativo), forma transitória (com o cisticerco em degeneração), forma inativa (quando o cisticerco está calcificado) e mista (quando são encontradas duas ou mais formas).

A manifestação dos sintomas não específicos e o alto custo dos exames de imagem dificultam o diagnóstico da NC (FERRER et al., 2005). Assim, a utilização de marcadores imunológicos presentes em amostras de soro ou de LCR de pacientes com NC, por apresentar custo bem menor em relação aos exames de imagem, aumenta a possibilidade de realizar o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes em tratamento.

A presença de anticorpos em amostra de soro ou de LCR humano pode persistir por longos períodos, mesmo após a eliminação do parasito, devido à variabilidade individual da resposta imune e/ou por tratamento com drogas (GARCIA et al., 1998). Ensaaios imunológicos para a detecção de anticorpos, embora, com indiscutível valor diagnóstico, podem indicar, também, apenas a exposição ao patógeno (FERRER et al., 2005). Processos inflamatórios, como, por exemplo, na meningite, o equilíbrio da barreira hemato-encefálica pode não ser mantido, e assim, serem detectados os anticorpos circulantes no LCR (ESPINDOLA et al., 2005).

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

O teste ELISA realizado com antígeno bruto de cisticercos de *T. solium* em amostras de soro e de LCR apresentou índices de sensibilidade de 70,6% e

94,1%, respectivamente, e especificidade de 80,0% e 100,0%, respectivamente (BUENO et al., 2000). Do ponto de vista prático, o ideal é o uso de um antígeno de obtenção rápida, com técnicas de fácil execução e de menor custo. Entre os diferentes antígenos estudados, aqueles ricos em glicoproteínas foram os que apresentaram melhores resultados (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; FELDMAN et al., 1990; PLANCARTE; FEXAS; FLISSER, 1994; RODRIGUEZ-CANUL et al., 1997; ITO et al., 1998; PLANCARTE et al., 1999; RESTREPO et al., 2000; PERALTA et al., 2002).

A padronização de ensaios com soros humanos pode ressaltar inconvenientes, como: resultados falso-positivos pela ocorrência de reatividade cruzada com outras doenças, particularmente parasitárias (ISHIDA et al., 2003) e ainda em indivíduos saudáveis (BUENO et al., 2000).

A baixa sensibilidade obtida por Earnest et al. (1987) com a utilização de antígenos brutos foi superada por Plancarte, Fexas e Flisser (1994) e outros autores (BUENO et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2005) ao realizar ensaios sorológicos com frações antigênicas 18- e 14-kDa purificadas, tornando, portanto, uma alternativa viável para o diagnóstico da NC.

O LCR utilizado no diagnóstico da NC apresenta inconveniente como a dificuldade para coleta da amostra, considerada um processo invasivo, doloroso e que requer profissional especializado e a possibilidade de falso-negativo, dependendo da fase da NC na ocasião da coleta (ESPINDOLA et al., 2005).

Nas últimas décadas, o diagnóstico laboratorial da NC utilizando amostras de soro e de LCR apresentou importantes resultados com o uso de: (1) antígenos de cisticercos de *T. solium* (BUENO et al., 2000) ricos em glicoproteínas e com elevado conteúdo de manose importantes na interação com anticorpos

específicos (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; PLANCARTE et al., 1999) e (2) antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) brutos (VAZ et al., 1997b; BUENO et al., 2000) ou purificados (PERALTA et al., 2002; ESPINDOLA et al., 2005).

A dificuldade na obtenção dos cisticercos de *T. solium* e o alto custo das técnicas de imagem favorecem a procura de novos recursos, como a possibilidade de se utilizar o modelo experimental de *T. crassiceps*.

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

A presença de proteínas em comum nos antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps* e a dificuldade em se obter cisticercos de *T. solium* têm feito do antígeno de *T. crassiceps* uma opção no diagnóstico da cisticercose (BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2001; ESPINDOLA et al., 2002).

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

A *T. crassiceps* é um cestóide de raposa, isolada no Canadá em 1962, tendo sido relatadas infecções naturais e experimentais com a forma larvária em roedores. A partir de inoculações em camundongos, via intraperitoneal, foi isolada a cepa ORF (Ontary Research Foundation, Canadá) (FREEMAN, 1962). Essa cepa possui reprodução assexuada por meio de brotamentos a partir da membrana, podendo ser facilmente mantida em peritônio de camundongo (LARRALDE et al., 1989; VAZ et al., 1996). Devido às suas propriedades biológicas, constitui um importante modelo laboratorial para o desenvolvimento de antígenos para o diagnóstico da NC (BUENO et al., 2000).

Larralde et al. (1990) demonstraram a reatividade cruzada entre o antígeno obtido de cisticercos de *T. crassiceps* e anticorpos anti-*T. solium*, presentes em amostras de LCR de pacientes com NC. Em imunoblot, proteínas de 18 e 14 kDa presentes em líquido vesicular de *T. crassiceps* (LV-Tcra) foram consideradas imunodominantes para o diagnóstico da NC (ESPINDOLA et al., 2005).

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

Utilizando ELISA com líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*, (LV-Tcra), os índices de sensibilidade no soro e LCR foram de 91,2% e 95,6%, respectivamente, e especificidade de 80,0% e 100,0%. Pela técnica de imunoblot, entre as proteínas identificadas, as menores que 30 kDa foram consideradas específicas para o imunodiagnóstico da NC (BUENO et al., 2000).

Anticorpos policlonais obtidos a partir de coelhos imunizados com *T. crassiceps* foram utilizados para a pesquisa de antígenos em amostras de LCR de pacientes com NC (PARDINI et al., 2001). Os índices de sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, 90,0% e 98,0%. Os antígenos identificados por esses anticorpos policlonais foram caracterizados como frações menores que 20-kDa.

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

O imunodiagnóstico da cisticercose é baseado em técnicas de alta sensibilidade e especificidade para identificação de anticorpos em amostras de LCR e soro de pacientes com NC nas fases de degeneração do parasito (TSANG et al., 1989). Por outro lado, os parasitos vivos podem evadir do sistema imune do hospedeiro por um tempo prolongado (EARNEST et al., 1987). Assim, os testes para pesquisa de anticorpos podem ser negativos nas amostras analisadas (BUENO et al., 2000). Nesse caso, seria importante pesquisar antígeno nas amostras coletadas, como por exemplo, antígeno de excreção e secreção do parasito (PARDINI et al., 2001).

Estudos interessantes foram feitos para a análise da cinética dos antígenos produzidos e excretados pelas larvas de *Taenia solium* (ES) (DRAELANTS et al., 1995b). A liberação de antígenos circulantes não significa que necessariamente o parasito esteja viável. Existe a possibilidade de serem detectadas no hospedeiro proteínas resultantes da destruição do parasito, que podem permanecer por um determinado tempo na circulação e não serem caracterizadas como antígeno ES. Identificar os antígenos ES envolvidos com mecanismos parasitários ajudaria a esclarecer se as larvas estão viáveis ou não. No entanto, um problema enfrentado por muitos pesquisadores na execução desses experimentos é a dificuldade na obtenção de formas viáveis a partir de pacientes. A existência das larvas de *T. crassiceps* tornou possível o desenvolvimento de um modelo experimental para o estudo da cisticercose.

A avaliação da cinética de detecção de antígenos pode ajudar a esclarecer a relação parasito-hospedeiro e auxiliar na determinação do estado em que se encontra o parasito, ou seja, se ele está íntegro, em processo inflamatório ou calcificado, direcionando assim a determinação de uma terapia ideal aplicada ao paciente.

No entanto, em humanos com cisticercose, o acompanhamento da detecção é dificultado, principalmente porque, de um modo geral, o diagnóstico é feito por acaso quando o paciente apresenta sintomatologia, que é comum a outras doenças neurológicas.

De um modo geral, os antígenos ES detectados em humanos e animais com cisticercose são glicoproteínas e parecem ser bastante imunogênicos por serem eles os que apresentaram, na maioria dos casos, reatividade com os AcMos anti-cisticercos. Inclusive, o antígeno ES-Tcra em estudos anteriores, apresentou grande

imunogenicidade para produção de AcMos anti-ES e com sucesso em aplicação na pesquisa de *T. solium* em amostras LCR de pacientes com NC. Os antígenos identificados por esses anticorpos foram caracterizados como frações menores que 20- kDa. (PARDINI et al., 2001; ESPINDOLA et al., 2002).

A investigação do papel dos antígenos circulantes na cisticercose foi feita anteriormente em nosso laboratório. Nesse trabalho, a produção e a caracterização de antígeno de excreção e secreção foram feitas a partir de larvas de *T. crassiceps* cultivadas *in vitro* com meio PFHM (protein-free hybridoma médium) (ESPINDOLA et al., 2002). O meio de cultura utilizado foi pobre em nutrientes, para evitar interferentes na composição do antígeno ES, no entanto, as larvas se mantiveram viáveis por tempo prolongado, sendo que, após 48 horas os parasitos começaram a degenerar, e não mais secretaram antígeno ES (ESPINDOLA, 2004).

Sabe-se da importância da caracterização dos antígenos ES, bem como da dificuldade de sua obtenção em quantidade suficiente para os estudos da cisticercose. O baixo rendimento, cultivos feitos em CO₂, procedimento asséptico e meio dispendioso dificultaram os ensaios anteriores. Assim, novos estudos foram direcionados visando à obtenção de antígenos de excreção e secreção de *T. crassiceps*, utilizando métodos mais simples e com bom rendimento protéico.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi a obtenção e caracterização do antígeno de excreção e secreção de larvas de *Taenia crassiceps*.

Os objetivos específicos foram:

- Obtenção *ex vivo* de antígeno de excreção e secreção de cisticercos de *T. crassiceps*;
- Avaliar a reatividade das proteínas do antígeno de excreção e secreção frente aos anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* e anticorpos de amostras humanas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PARASITOS

Animais experimentais foram utilizados após parecer favorável do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 81/2005) da FCF em 05/09/2005, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1.1 *Taenia crassiceps*

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

3.2 EXTRATOS ANTIGÊNICOS

Foram utilizados diferentes extratos antigênicos: líquido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps* (LV-Tcra) (VAZ et al., 1997b) com algumas modificações e excreção e secreção de cisticercos de *T. crassiceps* (ES-Tcra) (ESPINDOLA et al., 2002).

3.2.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO DE *T. crassiceps*

As larvas de Tcra foram retiradas dos animais que apresentaram aumento do volume abdominal (ascite), depositadas em béquer estéril para serem processadas imediatamente. Foram realizadas 8 lavagens manuais com PBS (Na_2HPO_4 0,0075 M, NaH_2PO_4 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2) estéril na proporção 1:10. A cada enxágüe o procedimento foi realizado de forma lenta, manual e com agitação de 2 a 4 minutos. Em frascos estéreis foram adicionados mais ou menos

1000 cistos e 10 mL de TRIS 9mM pH 7,2 com 1 mM EDTA. Os tubos foram deixados em repouso por 3 horas. Após este período foi retirado o máximo de sobrenadante possível, centrifugou-se a 10000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 45 µm e o material obtido foi chamado de ES. O ES foi submetido ao tratamento por ultra-som (Ultrasonic Power Unit – MSE, EUA) em 4 ciclos de 30 segundos a 1 mA e 20 kHz, em banho de gelo, constituindo o extrato antigênico ES. Ao antígeno obtido foram adicionados inibidores de proteases PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil) e Iodoacetamida, na concentração final de 4×10^{-1} mM e então, dividido em alíquotas e conservado a -20°C (VAZ et al., 1997b). Depois de liofilizado, foi solubilizado em salina estéril com o menor volume possível e estocado a -20°C até o momento do uso.

3.2.2 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS ES EM DIFERENTES TEMPOS

O procedimento foi o mesmo utilizado na obtenção do antígeno ES com modificações em relação ao tempo de repouso do sobrenadante. No primeiro momento foram colhidos os sobrenadantes com grupos de diferentes larvas nos seguintes tempos 30, 60, 120 e 180 minutos, chamados de **ES 30**, **ES 60**, **ES 120** e **ES 180**, respectivamente.

No segundo momento foram colhidos os sobrenadantes com o mesmo grupo de larvas nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos, denominados de **ES 0-30**, **ES 30-60**, **ES 60-120** e **ES 120-180**, respectivamente.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO ES

Todos os extratos antigênicos foram caracterizados quanto à concentração de proteínas.

3.3.1 DOSAGEM PROTÉICA E RENDIMENTO DOS ANTÍGENOS ES

As proteínas dos antígenos ES foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como padrão.

3.3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS POR SDS-PAGE

Os extratos antigênicos ES foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato duodecil de sódio (SDS-PAGE) sob condições redutoras em sistema descontínuo (LAEMMLI, 1970). Utilizou-se padrão de baixo peso molecular 14,4 a 97 kDa (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla, Suécia).

Para a montagem do gel, foram utilizadas placas de 14,5 cm de comprimento e 16,5 cm de largura e 0,75 cm de espessura. Foram utilizados gel de separação 15%, gel gradiente de 7-20% e gel de empilhamento a 5% em sistema descontínuo. Os antígenos foram diluídos em tampão de amostra e submetidos a aquecimento em banho de água fervente durante 5 minutos e aplicados nas concentrações 10 e 12 µg/mm.

As corridas eletroforéticas (Bio Rad Laboratories Inc., Califórnia, EUA) foram realizadas em tampão de corrida pH 8,3 e iniciadas a 60 V até a passagem da amostra do gel de empilhamento para o gel de separação, quando a voltagem foi aumentada e mantida a 150 V, até a chegada do marcador azul de bromofenol (Pharmacia Biotech, Suíça) no final do gel.

Os antígenos foram visualizados pela coloração Coomassie Blue.

3.4 AMOSTRAS UTILIZADAS

3.4.1 ANTICORPOS MONOCLONAIS anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso E anti-E-Tso

Os anticorpos monoclonais (AcMos) anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso foram produzidos por Espindola et al. (2002). Camundongos Balb/c foram imunizados com diferentes antígenos (ES-Tcra, LV-Tcra, LV-Tso, T-Tso e E-Tso). Após um tempo viável, os camundongos foram sangrados e os soros obtidos foram estocados até o momento de uso. Um camundongo de cada grupo de antígeno foi selecionado para a fusão celular que foi realizada de acordo com Köhler e Milstein (1975), com algumas modificações.

Os hibridomas obtidos da fusão a partir de animais imunizados com antígeno de *T. crassiceps* e *T. solium*, que apresentaram reatividade por ELISA foram clonados por diluição limitante. De cada hibridoma clonado, o poço que apresentou a maior densidade óptica por ELISA foi selecionado para ser re-clonado. As células selecionadas na re-clonagem foram isotipadas e expandidas *in vitro* ou *in vivo*.

O processo de purificação dos anticorpos monoclonais iniciou-se com tratamento do líquido ascítico para retirar os lipídeos e posteriormente por cromatografia de afinidade.

Na Tabela 1 estão apresentadas as reatividades prévias dos AcMos anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso por ELISA e especificidade por imunoblot utilizando os antígenos LV-Tcra e *T. solium*.

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso obtidos, suas reatividades por ELISA e especificidade por imunoblot utilizando os antígenos LV-Tcra e *T. solium*.

AcMos	Clone	ELISA (reatividade)				Isótipo	Imunoblot (kDa)	
		1	2	3	4		1	3
Anti-LV-Tcra	LV	+	+	+	-	IgG1	18 e 14	14
Anti-ES-Tcra	ES	+	+	+	-	IgG2b	18 e 14	14
Anti-LV-Tso	B6	+	+	-	-	IgG1	-	14
	A3	+	+	-	-	IgG1	18 e 14	14
Anti-T-Tso	B4	+	+	+	-	IgG1	18 e 14	14
	A6	+	+	+	-	IgG1	18 e 14	14
	B11	+	+	+	-	IgG1	18 e 14	14
Anti-E-Tso	B8	-	-	+	+	IgG1	-	14

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

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

3.4.2 SOROS E LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO (LCR) DE HUMANOS

Este estudo foi realizado de acordo com as normas éticas para pesquisa envolvendo seres humanos, vigentes no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), após parecer favorável da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da FCF/USP nº 188/203, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre o assunto (BRASIL, 1996).

Um total de **102 soros** foram utilizados para o estudo da caracterização do antígeno ES, e distribuídos da seguinte maneira: **trinta e seis** soros de pacientes com **neurocisticercose (NC)**, **28** soros de indivíduos supostamente saudáveis (**GC**) e **38** de outras parasitoses (**OP**), **44 LCR (16-NC e 28-GC)**.

Trinta e seis amostras de soros e **16 LCR** de **pacientes com neurocisticercose (NC)** confirmadas por critérios clínicos, laboratoriais e por exames de imagem, foram cedidas pelo Prof. Dr. Luís dos Ramos Machado e Prof. Dr. José Antônio Livramento – Departamento de Neurologia da Faculdade de

Medicina, Universidade de São Paulo – FMUSP e Prof. Dr. Osvaldo Massati Takaynagui – Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRPUSP.

As **28 amostras de soros** utilizados de **indivíduos supostamente saudáveis – grupo controle (GC)** foram cedidas pelo Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) de indivíduos que não relatavam sintomas clínicos e estavam realizando exames de rotina. Os soros foram selecionados pela ausência de reatividade para cisticercose no teste ELISA.

Das **38 amostras de soros de pacientes com outras parasitoses (OP)**, **Dez** de pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de hidatidose, gentilmente cedidas pela Dra. Fátima Tiecher do Instituto de Pesquisas Biológicas (Porto Alegre, Rio Grande do Sul). **Oito** com a doença de Chagas cedidas pela Dra. Eufrosina Setsu Umezawa do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo. **Dez** com toxocaríase cedidas pela Dra. Guita Rubinsky Elephant, do Laboratório de Toxocaríase, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo. **Dez** amostras com esquistossomose cedidas pelo Dr. Edward José de Oliveira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – FCF/USP.

As **28 amostras LCR do GC** fazem parte da coleção do Laboratório de Imunologia Clínica FCF-USP e foram utilizadas no projeto de pesquisa da Dra. Ednéia Casagrande Bueno (1999).

3.5 REATIVIDADE DAS FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DO ANTÍGENO ES FRENTE AOS AcMos anti-*T. crassiceps* E anti-*T. solium* E ÀS AMOSTRAS HUMANAS

Para melhor caracterização do antígeno ES foi realizado imunoblot (IB),

utilizando AcMos anti-ES-Tcra, anti-LV-Tcra, anti-LV-Tso, anti-T-Tso e anti-E-Tso, soros de pacientes com NC, OP e GC e LCR com NC e grupo controle.

Após a eletroforese do antígeno ES, foi realizada transferência dos peptídeos separados por SDS-PAGE do gel para membranas de nitrocelulose 0,2 μ (Milipore, EUA) segundo a metodologia descrita por Towbin et al. (1979). A transferência foi realizada em sistema úmido utilizando cuba eletroforética (TE 42 Transphor Unit, Amershan Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) a 4°C durante 16-18 horas a 50 V. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau-S 0,5% (Serva Feinbiochemical, GmbH e Co. KG, Alemanha), descorada com água destilada para a retirada do excesso de corante e armazenada entre papéis de filtro a 4°C.

Para a realização da reação imunoenzimática (IB), as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura e acondicionadas em compartimento apropriado e lavadas com PBS (Na_2HPO_4 0,0075 M, NaH_2PO_4 0,025 M e NaCl 0,14 M, pH 7,2) contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e foi feito o bloqueio dos sítios livres remanescentes na membrana por 2 horas à temperatura ambiente, com solução bloqueadora composta por uma solução a 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba, SP, Brasil) em PBS-T, sob agitação leve, constante e à temperatura ambiente. Após uma lavagem de 5 min foi adicionado 700 μL de amostras ou AcMos, diluídos 1:50 (soros); 1:10 (LCR) e 1:200 (AcMos) em leite 1% preparado em PBS-T e incubadas durante 18 horas a 4°C sob agitação leve e constante. Foram realizadas 4 lavagens de 5 min. Procedeu-se a incubação do conjugado anti-IgG humana biotinilado/avidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) Cambridge Biotech corporation, Raritan, N. J., USA) ou anti-camundongo-fosfatase alcalina (Bio Rad Laboratories), diluídos 1:1000 e 1:2000 em leite 1%, respectivamente. A reação foi incubada por uma hora. Após 3 lavagens em PBS-T e

uma em Tris-Salina (T/S; tris-hydroxymethylaminoethane 0,01 M e NaCl 0,15 M pH 7,4), as bandas reativas do antígeno ES foram reveladas com solução cromógena composta de 3,0 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) dissolvido em 1 mL de metanol e 5,0 mL de T/S mais 5 μ L de H₂O₂. No IB utilizando AcMos anti-IgG-camundongo, a última lavagem foi realizada com tampão bicarbonato de sódio/MgCl₂ 2 M, após adicionado 800 μ L do substrato preparado com nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (NBT/BCIP) (Sigma). A reação enzimática foi interrompida com lavagens em água e secas à temperatura ambiente. Os cálculos de mobilidade relativa (*relative front*, Rf) e massa molecular foram calculados segundo Lambin et al. (1976).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ANTIGÊNICO ES

4.1.1 RENDIMENTO PROTÉICO DOS ANTÍGENOS DE EXCREÇÃO/SECREÇÃO de *Taenia crassiceps* (ES)

Os resultados dos extratos antigênicos quanto à concentração de proteínas foram realizados pelo método de Lowry et al. (1951).

Na Tabela 2 estão apresentadas as quantidades de proteínas excretadas/secretadas (ES) pelas larvas de Tcra e seus respectivos rendimentos.

Tabela 2 - Concentração protéica e rendimento do extrato antigênico ES

Antígenos	Volume (mL)	Proteínas (mg/mL)	Quantidade de proteína final (mg)	Rendimento
ES 30**	1,5	1,10	1,65	0,4 µg/cisto
ES 60**	1,8	5,47	9,85	2,4 µg/cisto
ES 120**	2,0	5,70	11,40	2,9 µg/cisto
ES 180*	2,5	14,95	37,38	2,5 µg/cisto

* Foram processados 15 animais de 1000 cistos = aproximadamente 15000 cistos

** Foram processados 4 animais aproximadamente 4000 cistos

Pode-se observar que o rendimento do antígeno ES foi em torno de 2,5 µg/cisto a partir de 60 minutos, ao contrário da menor produção nos primeiros 30 minutos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS ES 30, ES 60, ES 120 E ES 180 POR SDS-PAGE

A Figura 1 apresenta o perfil eletroforético dos extratos antigênicos **ES 30, ES 60, ES 120, ES 180 e LV-Tcra** contendo 10 µg/mm e do padrão de baixo peso por SDS-PAGE e corados por Coomassie Blue.

Figura 1 - SDS-PAGE (7-20%) dos antígenos ES. **(P)** Padrão de baixo peso molecular; **ES 30; ES 60; ES 120; ES 180 e LV-Tcra**, aplicados 10 µg/mm.

Com exceção do ES 30, os demais ES 60, ES 120 e ES 180 apresentaram maior concentração de proteínas abaixo de 30-kDa. Foram observadas também frações protéicas entre 94- e 10-kDa.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS ES 0-30, ES 30-60, ES 60-120 E ES 120-180 POR SDS-PAGE

Na Figura 2, encontra-se o perfil eletroforético do antígeno de excreção/secreção obtido durante 180 minutos (**ES 0-30, ES 30-60, ES 60-120 e ES 120-180**) em SDS-PAGE e corado por Coomassie Blue. As concentrações protéicas foram 0,90 mg/mL; 1,28 mg/mL; 0,85 mg/mL e 1,17 mg/mL respectivamente.

Figura 2 - SDS-PAGE (7-20%) dos antígenos ES até 180 minutos. **(P)** Padrão de baixo peso molecular; **ES 0-30; ES 30-60; ES 60-120; ES 120-180**, aplicados 12 µg/mm.

Pode-se observar que o perfil eletroforético das proteínas separadas por SDS-PAGE foi semelhante, apresentando maior concentração de proteínas abaixo de 30-kDa, bem como proteínas distribuídas entre 97- e 10-kDa. Menor intensidade foi observada nos ES 60-120 e ES 120-180.

4.4 REATIVIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS anti-*T. crassiceps* E anti-*T. solium* COM O ANTÍGENO ES 180

Como o padrão de peptídeos observados no SDS-PAGE foi semelhante em todos os ES produzidos, optou-se por utilizar o ES 180 para fazer os ensaios de caracterização com os AcMos e soros humanos.

Foi utilizado um total de 8 AcMos: 2 anti-Tcra (1 anti ES-Tcra e 1 anti-LV-Tcra) e 6 anti-*T. solium* (2 anti-LV-Tso (A3 e B6); 3 anti-T-Tso (A6, B11 e B4); e 1 anti-E-Tso B8).

Na Tabela 3 e na Figura 3 estão apresentados os 8 AcMos (anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium*) produzidos anteriormente em nosso laboratório e suas especificidades por imunoblot, utilizando os antígenos LV-Tcra (ESPINDOLA, 2004) e ES 180.

Tabela 3 - Anticorpos Monoclonais anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* obtidos e suas especificidades por IB utilizando antígenos LV-Tcra e ES 180.

AcMos	Clones	Imunoblot (kDa) (especificidade)	
		LV-Tcra	ES 180
Anti-ES-Tcra	ES	18 e 14	18 e 14
Anti-LV-Tcra	LV	18 e 14	18 e 14
Anti-LV-Tso	A3	18 e 14	18 e 14
	B6	-	-
Anti-T-Tso	A6	18 e 14	18 e 14
	B11	18 e 14	18 e 14
	B4	18 e 14	18 e 14
Anti-E-Tso	B8	-	-

(-) ausência de reatividade

Figura - 3 IB (SDS-PAGE: 7-20%) do antígeno ES 180 com AcMos: **(1)** Anti-LV-Tcra, **(2)** Anti-ES-Tcra; Anti-LV-Tso: **(3)** B6, **(4)** A3; Anti-T-Tso: **(5)** B4, **(6)** B11, **(7)** A6 e Anti-E-Tso **(8)** B8, utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm).

Os resultados do imunoblot mostraram que somente 6 AcMos (**anti-LV-Tcra; anti-ES-Tcra; anti-LV-Tso: A3; anti-T-Tso: B4, B11 e A6**) reconheceram as frações 18- e 14-kDa do antígeno ES 180.

4.5 PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES COM NC E GC

Na Figura 4, encontra-se a reatividade de algumas amostras de soros de pacientes com NC e GC com o extrato antigênico ES 180.

Figura 4 - IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com algumas amostras de soros NC **(a)** e GC **(b)**. Controle do Conjugado (B), Controle Negativo (C⁻) e Controle Positivo (C⁺).

As amostras de soros NC (Figura 4a) apresentaram reatividade com frações entre 94- e 14-kDa do antígeno ES 180. Das 36 amostras NC, 32 (89%) foram reativas no IB ES 180, uma reconheceu apenas a fração a 18-kDa (2,8%), 6 (16,7%) somente a fração 14-kDa e 25 (69,4%) ambas as frações. Todos os soros do grupo controle reagiram com pelo menos uma das proteínas acima de 30-kDa do antígeno ES 180. Apenas uma delas também reconheceu a fração 16-kDa, com aspecto diferente da reatividade das amostras NC (Figura 4b).

4.6 PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE LCR DE PACIENTES COM NC E GC

Nas Figuras 5 e 6, encontra-se a reatividade de algumas amostras LCR de pacientes com NC e GC, respectivamente, com o extrato antigênico ES 180.

Figura 5 - IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 $\mu\text{g}/\text{mm}$) com algumas amostras de LCR-NC. Controle do Conjugado (B) e Controle Positivo (C^+).

Figura 6 - IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 $\mu\text{g}/\text{mm}$) com algumas amostras LCR-GC. Controle do Conjugado (B) e Controle Positivo (C^+).

As amostras de LCR de pacientes com NC (Figura 5) apresentaram reatividade com as frações entre 94- e 14-kDa do antígeno ES 180. As amostras LCR do GC (Figura 6) não foram reativas com o antígeno ES 180.

4.7 PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 180 COM AMOSTRAS DE SOROS DE PACIENTES COM OUTRAS PARASITOSES

A Figura 7 apresenta a reatividade e amostras de pacientes com esquistossomose mansônica (1-10) e toxocaríase (11-20) com o extrato antigênico ES 180.

Figura 7 - IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com soros de pacientes com **esquistossomose mansônica** (1-10); soros de pacientes com **toxocaríase** (11-20); **B** (Controle do Conjugado); **C⁺** (controle positivo).

Na Figura 7 o IB mostrou que as amostras de soros apresentaram reatividade com o antígeno ES 180 com pelo menos uma das seguintes proteínas 71-, 54- e 45-kDa.

A Figura 8 mostra por IB a reatividade das amostras de pacientes com hidatidose (1-10) e Chagas (11-18) com o extrato antigênico ES 180.

Figura 8 - IB (SDS-PAGE: 7-20%) utilizando antígeno ES 180 (12 µg/mm) com soros de pacientes com **Hidatidose (1-10)** e **Chagas (11-18)**; **B** (Controle do Conjugado); **C⁺** (controle positivo); **C⁻** (controle negativo).

As amostras de soros dos pacientes com hidatidose apresentaram reatividade com o antígeno ES 180 com pelo menos uma das seguintes proteínas 71-, 67-, 54-, 45-, 38-, 30-, 22- e 10-kDa. As amostras dos pacientes com Chagas não apresentaram reatividade com proteínas abaixo de 30-kDa.

A Figura 9 mostra a frequência (%) de reatividade das frações do antígeno ES 180 no imunoblot com amostras de pacientes com NC (36-soros e 16-LCR), GC (28-soros e 28-LCR) e 38 amostras OP.

Figura 9 – Frequência (%) de reatividade das frações protéicas do antígeno ES 180 no IB com amostras de NC (36-soros e 16 LCR), GC (28 soros e 28 LCR) e 38 amostras OP.

4.8 PERFIL DE REATIVIDADE DO ANTÍGENO ES 0-30; 30-60; 60-120 E 120-180 MINUTOS COM AcMos anti-*T. crassiceps* E anti-*T. solium* E AMOSTRAS HUMANAS

Estudos preliminares do antígeno ES 0-30; 30-60; 60-120 e 120-180 minutos com alguns soros de pacientes NC e AcMos (anti ES-Tcra e anti-LV-Tcra) mostraram no imunoblot um perfil protéico similar ao apresentado pelo antígeno ES

180, reconhecendo frações distribuídas entre 94- e 10-kDa nos pacientes com NC e as frações 18-e 14-kDa nos AcMos (resultados não apresentados).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo contribuir com o estudo da imunologia da NC pela obtenção *ex vivo* de antígeno de excreção e secreção de cisticercos de *T. crassiceps* e a avaliação da reatividade das proteínas desse antígeno frente a anticorpos monoclonais anti-*T. crassiceps* e anti-*T. solium* e anticorpos de amostras humanas.

Nossa equipe, ao longo destes anos, vem desenvolvendo o diagnóstico laboratorial da NC utilizando antígenos brutos e purificados de *T. crassiceps* (BUENO et al., 2000; ESPINDOLA et al., 2005), para a pesquisa de anticorpos, estudos epidemiológicos e para o entendimento da complexa relação parasito-hospedeiro (BUENO et al., 2001).

Como alternativa, no imunodiagnóstico da NC, antígenos heterólogos de *T. crassiceps* (FREEMAN, 1962) vêm sendo utilizados devido à reatividade cruzada observada entre as duas espécies de *Taenia* – *T. solium* e *T. crassiceps*, pois ambas compartilham antígenos imunodominantes (LARRALDE et al., 1990; VAZ, 1993; VAZ et al., 1997; BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPINDOLA et al., 2005).

As vantagens da utilização do antígeno heterólogo são: fácil obtenção, garantia de homogeneidade nos lotes preparados, baixo custo, boa qualidade, reprodutibilidade e eficiência.

Espindola et al. (2002) obtiveram o antígeno ES de larvas de *Taenia crassiceps* em meio de cultura e verificaram a reatividade cruzada com anticorpos anti-Tso. Larvas de Tcra foram mantidas em meio livre de proteínas, o meio foi substituído após 24, 48, 96 e 144 horas. O antígeno ES foi analisado por SDS-PAGE e imunoblot. Por SDS-PAGE após 24 horas e 48 horas foram identificadas proteínas

de 18- e 14-kDa. Por imunoblot, detectou-se uma proteína adicional de 30-kDa somente após 48 horas.

A decisão em produzir antígeno ES de *T. crassiceps* por metodologia diversa da anterior (ESPINDOLA et al., 2002) foi introduzir método simples, rápido e de baixo custo. Optou-se pela metodologia de Lopez et. al. (2004) que obtiveram antígeno E/S de larvas de *Taenia solium* extraídas de tecido muscular de suínos.

Espíndola et al. (2002) obtiveram antígeno ES de *T. crassiceps* sensível e específico para o diagnóstico da NC, mas de difícil produção. Esse antígeno era constituído apenas de proteínas 18- e 14-kDa. Nossa expectativa para o novo ES, era a possibilidade de produzir um antígeno composto das proteínas, 18- e 14-kDa, importantes no imunodiagnóstico da cisticercose humana. No entanto, observamos que o antígeno ES obtido apresentou um padrão de constituição protéica e de reatividade semelhante ao líquido vesicular de *T. crassiceps*, ou seja, sensível e pouco específico.

Como o antígeno ES foi obtido quase imediatamente após a retirada dos parasitos do hospedeiro consideramos este procedimento de obtenção de antígeno *ex vivo*.

Antígenos de ES de Tcra de baixo peso molecular são prováveis constituintes do antígeno LV-Tcra e parecem ter um papel supressor sobre a resposta imune do hospedeiro (BUENO et al., 2001).

O método de obtenção do antígeno ES utilizado nesse trabalho apresentou a vantagem de não prejudicar a dosagem protéica ou a execução do SDS-PAGE, por não empregar meio de cultura em relação ao método de obtenção do ES de *T. crassiceps*, utilizando meio de cultura enriquecido e suplementado com

soro fetal (ESPINDOLA, 2004). Outra vantagem foi ser um método rápido sem a necessidade de procedimento asséptico e demorado.

A dosagem protéica dos antígenos ES (Tabela 2), mostrou que nos primeiros 30 minutos a quantidade de proteína por cisto (0,4 µg) foi inferior aos ES obtidos mais tardiamente (ES 60, 120 e 180). Analisando o SDS-PAGE, pode-se observar que realmente no ES 30 há menos proteínas pelo padrão de reatividade ser menos intenso quando comparado aos demais tempos de obtenção.

Nossos resultados apresentaram em média um rendimento de 2,5 µg/cisto, considerado maior quando comparado com estudos realizados por Espindola (2004), que estudando antígeno ES-Tcra *in vitro* obteve 1,3 µg/cisto em 24 horas, mas inferior se comparado com o antígeno ES-Tcra em 48 horas (5,2 µg/cisto) do mesmo trabalho.

A caracterização dos antígenos ES obtidos bem como o LV-Tcra mostraram padrão similar no SDS-PAGE, com proteínas distribuídas entre 94- e 10-kDa, sendo que as menores que 30-kDa apresentaram uma maior concentração. A caracterização do LV-Tcra confirma os resultados de estudos anteriores, que mostraram que aproximadamente 50% das proteínas do antígeno estão localizadas abaixo de 30-kDa (BUENO et al., 2000) e são consideradas imunodominantes no diagnóstico da cisticercose por outros autores (PARDINI et al., 2001; PERALTA et al., 2002; ESPINDOLA et al., 2005).

O perfil de composição protéica dos ES 30, ES 60, ES 120 e ES 180, apresentaram maior complexidade antigênica (Figura 1), quando comparado a antígenos ES produzidos em cultura ou *in vitro*, com o ES Tcra de Espíndola et al. (2002), o ES de larvas de Tso obtido por Ko e Ng (1998) que identificaram proteínas de 43-, 58- e 66-kDa. Estudos de Spolski et al. (2000) mostraram maior predomínio

no SDS-PAGE da fração 45-kDa das proteínas secretadas de *T. crassiceps* (ES) após o vigésimo dia de manutenção em cultura.

Quando foi realizada a caracterização por SDS-PAGE do antígeno ES com as amostras do mesmo grupo de larvas (ES 0-30; 30-60; 60-120 e 120-180), a reatividade foi menos intensa nas duas últimas coletas (ES 60-120 e 120-180). Provavelmente, a produção do ES foi máxima em 60 minutos. Mesmo tendo menor expressão nos ES 60-120 e 120-180, a quantidade foi suficiente para ser identificada no IB por anticorpos presentes em soros de pacientes NC (resultados não mostrados).

Os AcMos anti-Tso e anti-Tcra têm sido úteis na caracterização do antígeno LV-Tcra em nosso laboratório. Nesse contexto, optamos em utilizar os AcMos anti-Tcra e anti-Tso na caracterização do antígeno ES por imunoblot. Foi escolhido dentre os ES obtidos, o ES 180, uma vez que o padrão de proteínas observado no SDS-PAGE foi semelhante a todos os ES produzidos (Figura 1).

Dos oito AcMos utilizados, seis AcMos (anti-LV-Tcra; anti-ES-Tcra; anti-LV-Tso: A3; anti-T-Tso: B4, B11 e A6) reconheceram as frações 18- e 14-kDa do antígeno ES 180 (Figura 3; Tabela 3), corroborando com os resultados de Espíndola et al. (2005) que observaram reatividade dos AcMos anti-Tcra e anti-Tso apenas com as frações 18- e 14-kDa do antígeno LV-Tcra.

Em outros estudos foi observado que os AcMos anti-LV-Tcra e anti-ES-Tcra reconheceram as frações 18- e 14-kDa do ES de *Taenia crassiceps* (ESPINDOLA et al., 2002). Os AcMos anti-E-Tso (B8) e anti-LV-Tso (B6) não reconheceram frações do antígeno ES 180 (Tabela 3). Esses resultados não foram surpreendentes, uma vez que ambos monoclonais não apresentaram reatividade com LV-Tcra (ESPINDOLA, 2004). O AcMo anti-E-Tso clone B8 não mostrou

reatividade com o antígeno ES devido à larva de *T. crassiceps* não possuir escólex (E) e o AcMo anti-LV-Tso clone B6 provavelmente reconhecia epítomos exclusivos de Tso.

Os resultados do ES com anticorpos monoclonais foram animadores, uma vez que o IB mostrou a presença de proteínas antigênicas específicas de baixo peso molecular.

Dando continuidade aos estudos de caracterização dos antígenos ES, foi realizado imunoblot utilizando soros e LCR de pacientes com NC. Analisando o imunoblot utilizando antígeno ES 180 e soros de pacientes com NC, foi observado que anticorpos presentes nessas amostras reconheceram frações entre 94- e 14-kDa do antígeno ES 180, com diferentes perfis de reatividade.

Das 36 amostras de soro de pacientes com NC ensaiadas no imunoblot ES 180, 32 (89%) foram reativas (18- e/ou 14-kDa), sendo que uma reconheceu apenas a fração 18-kDa (2,8%), 6 (16,7%) somente a fração 14-kDa e 25 (69,4%) ambas as frações (Figuras 4a e 9). As quatro amostras negativas no imunoblot ES 180 apresentaram baixo índice de reatividade apenas com a fração 14-kDa do antígeno LV-Tcra (resultados não mostrados). Em estudos anteriores foram positivas quando ensaiadas por IB utilizando antígeno LV-Tcra, reconhecendo as frações 18 e 14. É possível que essas amostras não tivessem quantidade de anticorpos específicos para NC suficientes para identificar o antígeno ES 180 pelo IB.

O perfil de reconhecimento do ES 180 por anticorpos presentes em soro de pacientes com NC foi diferente do observado por Espíndola et al. (2002), que utilizando ES-Tcra obtido em cultura, somente as frações menores que 30 kDa foram identificadas por anticorpos presentes nas amostras de soro, concordando com o perfil de reatividade obtido em estudos anteriores (BUENO et al., 2000).

É possível que durante o processo de obtenção do ES, algumas proteínas de membrana (maior que 30 kDa) tenham se desprendido e solubilizado no material obtido ou então, durante as lavagens, as larvas de *T. crassiceps* tenham sofrido rupturas e o líquido vesicular, que é composto de frações entre 94- e 14-kDa, tenha sido acrescido aos antígenos ES obtidos.

Vários autores também relatam antigenicidade de frações de alto peso no antígeno LV-Tcra. Rossi et al. (2000), estudando soros de NC e antígeno LV-Tcra, identificaram no IB uma maior frequência das proteínas entre 50- e 13-kDa (29%) e 88- kDa (14%). Kunz et al. (1989), utilizando a técnica de marcação com Iodo 125, identificaram nove peptídeos (205- a 19-kDa) em amostras NC e antígeno LV-Tcra, destacando as frações 22-, 25-, 32- e 45-kDa. Em outros estudos, Lamsam e McManus (1990), descreveram um padrão de peptídeos do antígeno LV-Tcra variando entre 14- e maior que 116-kDa com predominância das frações de 14-, 27-, 55- e 68-kDa, nas cepas KBS e Tol de cisticercos de *T. crassiceps*.

Em outros estudos, como o de Greene, Wilkins e Tsang (1999), utilizando glicoproteínas de cisticercos *T. solium* (TSANG et al., 1989), 77% das amostras com NC reconheceram a fração 14-kDa e 46% a 18-kDa e os soros de indivíduos supostamente saudáveis e com outras parasitoses não reconheceram a fração 14-kDa. Peralta et al. (2002) identificaram as frações 50-, 42-, 39-, 24-, 21-, 18- e 14-kDa em amostras com NC quando utilizaram o antígeno bruto de *T. solium*.

Os resultados de IB do antígeno ES com amostras de soro de pacientes com outras parasitoses mostraram reatividade com frações acima de 30- kDa (Figuras 7, 8 e 9). A reatividade foi mais freqüente com a proteína 71-KDa, como observado também com as amostras de soro grupo GC (43%) (Figuras 4b e 9). Um total de 77%; 70%; 60% e 70% das amostras de pacientes com toxocaríase,

esquistossomose mansônica, hidatidose e Chagas, respectivamente, reconheceram a fração 71- kDa. As frações entre 67- e 30-kDa foram identificadas com frequência variada, pelas diferentes amostras de soros de pacientes com outras parasitoses. Outros autores observaram reação cruzada entre frações maiores que 30-kDa do líquido vesicular da *Taenia crassiceps* e amostras de pacientes com toxocaríase, esquistossomose e hidatidose (ISHIDA et al., 2003).

Em estudos anteriores, utilizando antígeno LV-Tcra e amostras com hidatidose, houve reação cruzada com frações acima de 30-kDa (BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005). Ishida et al. (2003) ensaiando amostras de toxocaríase e esquistossomose e antígeno LV-Tcra por IB, identificaram frações a partir de 27-kDa. Greene, Wilkins e Tsang (1999), ensaiaram 43 amostras de outras parasitoses com as proteínas 14- e 18-kDa de *T. crassiceps* e nenhuma delas apresentou reatividade.

A grande dificuldade em testes sorológicos para NC tem sido a reatividade cruzada entre cisticercose e soros de pacientes com outras parasitoses. De fato, o mais provável é que os parasitos compartilhem antígenos entre si. A função desses antígenos merece ser estudada particularmente, buscando eventual papel na evasão parasitária, ou na modulação da resposta imune celular (T_H1/T_H2). (BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPÍNDOLA et al., 2005).

Analisando o imunoblot utilizando antígeno ES 180 e amostras de soros de pacientes supostamente saudáveis (GC), observou-se que as amostras reagiram com proteínas acima de 30-kDa e somente uma reconheceu a fração 16-kDa, anômala em relação ao perfil 18- e 14-kDa (Figuras 4b e 9). Entre as frações reconhecidas, a 71- kDa foi a que apresentou maior índice de reatividade (43%)

(Figura 9). As frações menores que 30-kDa são específicas no imunodiagnóstico da NC e as de alto peso molecular caracterizadas como inespecíficas (ESPINDOLA et al., 2005). Esses resultados são em parte semelhantes aos relatados por nosso grupo (BUENO et al., 2000; BRAGAZZA et al., 2002; ISHIDA et al., 2003; ESPINDOLA et al., 2005).

Novamente, nos chama a atenção a reatividade freqüente de amostras de soro do GC, portanto de indivíduos sem cisticercose, com as proteínas de alto peso molecular. É possível que a população controle tenha sido infectada anteriormente por parasitos comuns em nosso meio, sobretudo os helmintos intestinais.

Quando os estudos de caracterização do antígeno ES foram feitos utilizando amostras de LCR de pacientes com NC, observou-se reatividade dessas amostras com as frações entre 94- a 30-kDa, bem como as frações 18- e 14-kDa. Das dezesseis amostras de LCR de NC ensaiadas, 13 (81%) apresentaram reatividade com as frações 18- e/ou 14-kDa, sendo que 9 (56%) reconheciam ambas as frações e 4 somente com a fração 14-kDa (Figuras 5 e 9). Uma das três amostras negativas apresentou fraca reatividade com a proteína 14-kDa do LV-Tcra.

A reatividade apresentada pelas amostras LCR-NC com o antígeno ES 180 foi semelhante a de outros estudos, que utilizaram o antígeno LV-Tcra e amostras de LCR-NC, nos quais as frações acima de 30-kDa também foram identificadas (BUENO et al., 2000). Rossi et al. (2000), ensaiando LCR NC e antígeno LV-Tcra obtiveram 70% das amostras identificando a fração 18-kDa; 42% a fração 32-kDa e 29% a fração 88-kDa. Molinari et al. (2002) identificaram frações entre 6,7- a 130-kDa com antígeno E/S de Tso e em 86% das amostras LCR NC a fração 45-kDa. Barcelos et al. (2001) identificaram 15 frações protéicas entre 8- a

114-kDa com extrato antigênico de Tso e Tcra. Já Fischer et al. (1994) identificaram apenas proteínas de alto peso molecular entre 118- e 132-kDa ao utilizarem antígenos recombinantes.

As amostras LCR de pacientes com outras doenças neurológicas (GC) não apresentaram reatividade com o antígeno ES 180 (Figuras 6 e 9). Esses resultados já eram esperados, uma vez que Bueno et al. (2000), utilizando antígeno de líquido vesicular de *T. crassiceps* também não observaram reatividade entre as proteínas desse antígeno e o LCR de pacientes com outras doenças. Não se pode comparar esse perfil (ES 180 e LCR) com os resultados obtidos por Espindola et al. (2002) que utilizaram antígeno ES de *T. crassiceps*, uma vez que esses autores não caracterizaram o antígeno ES-Tcra com amostras humanas de LCR. É muito provável que se fossem feitos ensaios com amostras GC e o antígeno ES de *T. crassiceps* em cultura, também não se tivesse observado a reatividade com alguma fração do ES, pois as proteínas menores que 30-kDa são específicas no imunodiagnóstico da cisticercose.

Em resumo, nossos resultados vêm concordar com estudos anteriores, nos quais foram demonstradas a imunodominância e a alta especificidade dos peptídeos de baixo peso molecular (ROSSI et al., 2000; MOLINARI et al., 2002; ESPÍNDOLA et al., 2005), permitindo a observação de bandas específicas que podem ser facilmente diferenciadas.

Estudos futuros devem incluir a investigação da forma biológica de cada proteína. Alguns autores já vêm utilizando essa abordagem de estudo.

Por exemplo, a cisteína-protease, na região de 43-kDa, parece ter um papel importante na interação entre os cistos de *Taenia* e imunoglobulinas do hospedeiro (IgG) que serão então degradadas (WHITE; BAIG; CHAPPEL, 1997). Por

outro lado, Tato et al., (2003) observaram que cisteína-protease obtida de larvas de Tso induzem apoptose nas células CD4+ *in vitro*, as quais regulam a resposta mediada pelo hospedeiro infectado, sugerindo papel de evasão parasitária por essa proteína.

Assim, os resultados obtidos com o Ag ES, embora não o indiquem para imunodiagnóstico, podem contribuir para futuros estudos no sentido de conhecer a complexa relação parasito-hospedeiro na cisticercose, incluindo mecanismos de evasão parasitária e papel imunomodulador.

A imunogenicidade dos antígenos ES e a capacidade de cada fração em induzir resposta protetora podem ser ainda exploradas na produção de vacinas para uso em suínos.

6 CONCLUSÕES

- Os antígenos ES são constituídos de proteínas com massa molecular entre 94- e 14-kDa;
- Os AcMos anti-Tso e anti-Tcra foram reativos especificamente com as frações 18- e 14-kDa do antígeno ES 180;
- As frações 18- e 14-kDa do antígeno ES foram reconhecidas apenas por soros e LCR de pacientes com NC;
- As amostras do GC (soro) e OP apresentaram reatividade com frações maiores que 30-kDa, sendo mais freqüentemente com a fração 71-kDa do antígeno ES 180.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAPEGEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.61, n.3-B, p.822-828, 2003.

BARCELOS, I. S. C.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of IgG in cerebral fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine and International Health**, v.6, n.3, p.219-226, 2001.

BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D. C.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMURA, P.M.; ESPÍNDOLA, N.M. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of rural brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.44, n.1, p.7-12, 2002.

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

BUENO, E.C. **Neurocisticercose: avaliação da resposta imune humoral nas diferentes fases evolutivas da doença pelo ELISA e imunoblot com antígenos de *T. solium* e *T. crassiceps***. 1999. 144f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

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

BUENO, E.C.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; ÁVILA, S.L.M.; FERREIRA A.W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v.126, n.2, p.304-310, 2001.

[†] As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR 6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BUENO, E.C.; SCHEEL, C.M.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; TSANG, V.C.W.; HANCOCK, K. Application of synthetic 8-KD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.2, p.278-283, 2005.

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

CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v.2, n.12, p.751-762, 2002.

CHUNG, J.; BAHK, Y.Y.; HUH, S.; KANG, S.Y.; KONG, Y.; CHO, S.Y. A recombinant 10 kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, n.4, p.1307-1315, 1999.

DEL BRUTTO, O.H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE JUNIOR, A. C.; TSANG, V.C.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; SCHANTZ, P.M.; EVANS, C.A.W.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J.C.; SARTI, E.; GONZALES, A.E.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, v.57, p.177-183, 2001.

DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, J., GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. **Research in Veterinary Science**, v.58, p.99-100, 1995 (b).

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

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

ESPÍNDOLA, N.M. **Caracterização de antígenos de cisticercos e sua aplicação para o diagnóstico da cisticercose humana**. São Paulo, 2004. 95p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo.

ESPÍNDOLA, N.M.; IHA, A.I.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O.M.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J. A.; MAIA, A.A.M.; PERALTA, J.M.; VAZ, A.J. Cysticercosis Immunodiagnosis Using 18- and 14- Kilodalton Proteins from *T. crassiceps* Cysticercus Antigens Obtained by Immunoaffinity Chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.7, p.3178-3184, 2005.

FELDMAN, M.; PLANCARTE, A.; SANDOVAL, M.; WILSON, M.; FLISSER, A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84, n.4, p.559-562, 1990.

FERRER, E.; CORTEZ, M.M.; CABRERA, Z.; ROJAS, G.; DÁVILA, I.; NOYA, B.A.; PEREZ, H.A.; FERNANDEZ, I.; ROMERO, H.U.; HARRISON, L.J.S.; MICHAEL, R.; PARKHOUSE, E.; GÁRATE, T. Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.99, n.8, p.568-576, 2005.

FISCHER, C.; Nosratian, R.; Habtemichael, N.; Tolle, R.; Riemenschneider, V.; Geyer E..Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. **Tropical Medicine Parasitology**, v.45, n.4, p.324-8, 1994.

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

FREEMAN, R.S. Studies of the biology of *Taenia crassiceps*. **Canadian Journal of Zoology**, v.40, p.969-990, 1962.

GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.; GILMAN, R.H. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, n.4, p.411-414, 1998.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.14, n.1, p.97-119, 2000.

GARCIA, H.H.; EVANS, C.A.W.; NASH, T.E.; TAKAYANAGUI, O.M.; WHITE, A.C.; WHITE JUNIOR, A.C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V.C.W.; SCHANTZ, P.M.; ALLAN, J.C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J.S.; MARTINEZ, S.M.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; DEL BRUTTO, O.H.

Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.747-756, 2002.

GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H.; THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. *Taenia solium* cysticercosis. **Lancet**, v.361, n.16, p.547-556, 2003.

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

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

ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOCINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v.89, n.1, p.73-84, 2003.

ITO, A.; PLANCARTE, A.; MA, L.; KONG, Y.; FLISSER, A.; CHO, S.Y.; LIU, Y.H.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M.W.; SCHANTZ, P.M. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n.2, p.291-294, 1998.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.

Ko, R. C.; Ng, T. F. Evaluation of excretory/secretory products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cysticercosis. **Journal of Helminthology**, v.72, p.147-154, 1998.

KUNZ, J.; KALINNA, B.; WATSCHKE, V.; GEYER, E. *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.271, p.510-520, 1989.

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

- LAMBIN, P.; ROCHU, D.; FINE, J.M. A new method for determination of molecular weights by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. **Analytical Biochemistry**, v.74, p.567-575, 1976.
- LAMSAM, S.; McMANUS, D.P. Molecular characterization of the surface and cyst fluid components os *Taenia crassiceps*. **Parasitology**, v.101, p.115-125, 1990.
- LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, n.3, p.282-290, 1989.
- LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R.M.; PALENGIA, G.; PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; DIAS, M.L.; SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitue those from porcine *Taenia solium*. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.114, n.9, p.926-928, 1990.
- LIVRAMENTO, J.A. Contribuição de reações de imunofluorescência no líquido cefalorraqueano ao estudo da neurocisticercose. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.39, n.3, p. 261-278, 1981.
- LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R.; SPINA-FRANÇA, A. Immunobiology of neurocysticercosis. In: FEJERMAN, N.; CHAMOLES, N.A; eds. **New trends in pediatric neurology**, Elsevier Science Publishers, p.307-312,1993.
- LOPEZ, J. A.; GARCIA, E.; CORTES, I. M.; SOTELO, J.; TATO, P.; MOLINARI, J. L. Neurocysticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titre of specific IgG in the cerebrospinal fluid. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.98, n.6, p.569-579, 2004.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p.265-275, 1951.
- MACHADO, A.B.B.; PIALARISSI, C.S.M.; VAZ, A.J. Cisticercose humana diagnosticada em hospital geral de São Paulo, SP (Brasil). **Revista de Saúde Publica**, v.22, n.3, p.240-244, 1988.
- MOLINARI, J.L.; GARCIA-MENDOZA, E.; DE LA GARZA, Y.; RAMIREZ, J.A.; SOTELO, J.; TATO, P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis

by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.66, n.6, p.777-781, 2002.

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

MOSES, A. Dos métodos biológicos de diagnóstico nas cysticercosis. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.3, p.320-327, 1911.

NASH, T.E.; NEVA, F.A. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. **New England of Journal of Medicine**, v.311, n.23, p.1492-1496, 1984.

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

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

PFUETZENREITER, M.R.E.; AVILA-PIRES, F.D.DE. Manifestações clínicas de pacientes com diagnóstico de neurocisticercose por tomografia computadorizada. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.57, n.3a, p.653-658, 1999.

PARDINI, A.X.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A. Cysticercus Antigens in Cerebrospinal Fluid Samples from Patients with Neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.9, p.3368-3372, 2001.

PERALTA, R.H.S.; VAZ, A.J.; PARDINI, A.; MACEDO, H.W.; MACHADO, L.R.; DE SIMONE, S.G.; PERALTA, J.M. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v.38, n.2, p.159-168, 2002.

PLANCARTE, A.; FEXAS, M.; FLISSER, A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v.24, n.5, p.733-738, 1994.

PLANCARTE, A.; HIROTA, C.; MARTINEZ-OCANA, J.; MENDOZA-HERNANDEZ, G.; ZENTERO, E.; FLISSER, A. Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. **Parasitology Research**, v.85, n.8-9, p.680-684, 1999.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of zoonotic cestode infections: an update. **Parasitology Research**, v.91, p.412-438, 2003.

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

RAMOS JÚNIOR, A.N.; MACEDO, H.W.; RODRIGUES, M.C.; PERALTA, R.H.; MACEDO, N.A.; MARQUES, M.D.A.C.; ALVES, J.R.; PAES, A.D.E.N.; CASTRO, J. A.; ARAUJO, A.J.; PERALTA, J.M. Seroepidemiological survey of human cysticercosis in a municipality of Piauí State, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.6, p.1545-55, 2004.

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

REY, L. Cisticercose humana. In: _____. **Parasitologia Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001. p.510-519.

RODRIGUEZ-CANUL, R.; ALLAN, J.C.; FLETES, C.; SUTISNA, I.P.; KAPTI, I.N.; CRIAG, S.P. Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.4, n.5, p.579-582, 1997.

ROSSI, N.; RIVAS, I.; HERNANDEZ, M.; URDANETA, H. Immunodiagnóstico de la neurocisticercosis: estudio comparativo de extractos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* y *Taenia crassiceps*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.52, p.157-164, 2000.

SCHANTZ, P. M.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAELOESKI, Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v.27, n.4, p.307-403, 1993.

SILVA, A.V.M. Teníase e Cisticercose In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W. A. **Parasitologia Humana**. 11: ed. São Paulo. Editora Atheneu, 2005. Cap. 25. p. 227-237.

SILVA-VERGARA, M.L.; PRATA, A.; VIEIRA, C. DE O.; CASTRO, J.H.; MICHELETTI, L.G.; OTANO, A.S.; FRANQUINI JUNIOR, J. The epidemiological aspects of taeniasis-cysticercosis in an endemic area of Lagamar, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.28, n.4, p.345-349, 1995.

SPOLSKI, R.J.; CORSON, J.; THOMAS, P.G.; KUHN, R.E. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. **Parasite Immunology**, v.22, p.297-305, 2000.

TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Neurocysticercosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.34, n.3, p.283-290, 2001.

TATO, P.; FERNANDEZ, A.M.; SOLANO, S.; BORGONIO, V.; GARRIDO, E; SEPULVEDA, J.; MOLINARI, J.L. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. **Parasitology Research**, v.92, n.3, p.197-204, 2003.

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

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 of Infectious Diseases**, v.159, n.1, p.50-59, 1989.

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

VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; CAMARGO, M.E.; CAMARGO, E.D.; FERREIRA, A. W. Dot-ELISA for detection of anti-*Cysticerci cellulosae* antibodies in human cerebrospinal fluid samples using a new solid-phase (resin-treated polyester fabrics) and *Cysticerci longicollis* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, n.6, p.391-396, 1996.

VAZ, A.J.; NAKAMURA, P.M.; BARRETO, C.C.; FERREIRA, A.W.; LIVRAMENTO, J.A. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis: use of heterologous antigenic particles (*Cysticercus longicollis*) in indirect immunofluorescence test. **Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease**, v.8, p157-161, 1997.

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.F.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.57, n.3, p.354-357, 1997b.

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, 2001. p.316-321.

WHITE, A.C. Jr.; BAIG, S.; CHAPPELL, C.L. Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 85, n. 2, p.243-253, 1997.

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

ANEXOS

ANEXO 1 – Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 18 de março de 2005.

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

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP nº 52

São Paulo, 27 de maio de 2003.

Ilmo(a). Sr(a)
Adelaide José Vaz

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

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

Atenciosamente,

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

ANEXO 3 – Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal

Of. CEEA nº 45/2005

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Obtenção e caracterização de antígeno de excreção e secreção de Taenia crassiceps” (Protocolo CEEA nº81), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Rosa Palmira Jacobo Goebbels e do orientador(a) Adelaide José Vaz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 05/09/2005.

São Paulo, 03 de setembro de 2005.

Prof.ª Dr.ª Lígia Ferreira Gomes
Coordenadora da CEEA