

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas

Polimorfismo por “Random Amplified Polymorphic DNA”
(RAPD) em metacestódeos de *Taenia solium*
provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil
e a reatividade de anticorpos IgG séricos de pacientes
com neurocisticercose frente aos isolados obtidos

Ivanildes Solange da Costa Barcelos

Uberlândia – MG

2006

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas

Polimorfismo por “Random Amplified Polymorphic DNA”
(RAPD) em metacestódeos de *Taenia solium*
provenientes de diferentes áreas geográficas do Brasil
e a reatividade de anticorpos IgG séricos de pacientes
com neurocisticercose frente aos isolados obtidos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Ivanildes Solange da Costa Barcelos

Orientadora: Profa. Dra. *Julia Maria Costa Cruz*

Uberlândia – MG

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- B242p Barcelos, Ivanildes Solange da Costa.
Polimorfismo por “Random Amplified Polymorphic DNA”
(RAPD) em metacestódeos de *Taenia solium* provenientes
de diferentes áreas geográficas do Brasil e a reatividade de
anticorpos IgG séricos de pacien-
tes com neurocisticercose frente aos isolados obtidos /
Ivanildes Solange da Costa Barcelos. - Uberlândia, 2006.
80f. : il.
Orientador: Julia Maria Costa Cruz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Neurocisticercose - Teses. I. Costa-Cruz, Julia Maria. II.
Univer-sidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Imuno-logia e Parasitologia Aplicadas. III.
Título.
- CDU: 616.831-
002.951.21

Trabalho realizado nos Laboratórios de Parasitologia e de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, MG sob a orientação da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz.

Mensagem

Fraternidade e Pessoas com Deficiência

Levanta-te, vem para o meio!

Campanha da Fraternidade 2006 - CNBB

Agradecimentos Especiais

À Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Assunção Andrade de Barcelos, meu esposo, pela paciência, incentivo e companheirismo que me encorajaram na realização desse trabalho.

Aos meus filhos: Hortênsia e os gêmeos Aurélio e Alexandre por fazerem parte da minha história, e pelo incentivo constante.

Ao meu pai Joaquim Miguel Costa “in memoriam” e a minha mãe Ozória M. de Jesus por terem educado os seus filhos com amor e a união de uma família cristã.

Aos meus irmãos: José Osmar, Irani, Amauri, Ilvani, Maurício e Júnio pelos momentos de alegria, recolhimento e esperança que passamos juntos durante a realização desse trabalho, que certamente me estimularam a seguir em frente.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, que me orientou na realização dessa tese com profissionalismo e atenção constantes.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas: Profa. Dra. Janethe Deolinda de Oliveira Pena, pela disponibilização dos equipamentos e reagentes do Laboratório sob sua responsabilidade para a execução dos ensaios de biologia molecular.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Souza, que muito contribuiu na realização dos procedimentos de biologia molecular e durante a banca de qualificação, a qual constituiu pré-requisito para a defesa dessa tese.

À Profa. Dra. Ana Maria Bonetti, pela atenção e disponibilidade com que participou da banca de qualificação, a qual me tornou apta a defesa dessa tese.

A todos os professores da Pós-Graduação pelo exemplo de trabalho sério e dedicação no desenvolvimento de projetos de pesquisa.

Ao neurologista Ms. Leandro P. Moura pela atenção e esclarecimentos sobre aspectos clínicos que os pacientes com neurocisticercose apresentam.

Ao Dr. Carlos Veira Vieira e a Msa. Luciana Londe pelos esclarecimentos quanto á execução das técnicas de biologia molecular e a interpretação dos resultados obtidos.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia, Maria das Graças, Maria do Rosário, Elaine, Scheila, Rosângela e Geraldo que me apoiaram durante a realização desse trabalho.

À Profa. Msa. Gleyce Alves Machado, pela sua valiosa contribuição na execução dos ensaios de biologia molecular.

Aos colegas da Pós-Graduação: Sandra, Juliana, Rosângela, Heliana e Ana Lúcia pela amizade e incentivo.

À Lísia Moura, discente do Curso de Medicina dessa Universidade, pela seriedade e compromisso na obtenção de amostras de sangue de pacientes do Hospital de Clínicas da UFU e participação na realização dos testes de imunodiagnóstico.

Aos secretários da Pós-Graduação: Neto e Lucileide pela atenção e cordialidade.

À secretária Jucélia, do Laboratório de Histologia, pela digitalização de figuras integrantes dos resultados desse trabalho.

Aos meus irmãos Júnio e Maurício, pela digitalização de figuras integrantes dos resultados desse trabalho e pela tradução do resumo para a língua inglesa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dessa tese.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Epidemiologia da Cisticercose Humana	07
1.2. Utilização da Biologia Molecular no Estudo de <i>T. solium</i>	08
1.3. Diagnóstico Imunológico da Cisticercose Humana	13
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Aspectos Éticos	20
3.2. Obtenção dos metacestódeos de <i>T. solium</i>	20
3.3. Biologia Molecular	20
3.3.1. Extração de DNA Genômico	20
3.3.2. Quantificação do DNA	21
3.3.3. Amplificação do DNA de metacestódeos de <i>T. solium</i> utilizando a “Random Amplified Polymorphic DNA”	22
3.3.4. Eletroforese em gel de agarose	22
3.4. Amostras de soro, preparação do extrato salino e ensaios Imunológicos	23
3.4.1. As Amostras de Soro	23
3.4.2. Preparo do Extrato Salino Total de metacestódeos de <i>T. solium</i>	24
3.4.3. Dosagem de Proteínas	25
3.4.4. Teste Imunoenzimático ELISA para Detecção de Anticorpos IgG anti- metacestódeos de <i>T. solium</i> em Amostras de Soro	25
3.4.5. Eletroforese em gel de Poliacrilamida e o Teste “Western Blotting” para Detecção de Anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> em Amostras de Soro	26
3.5. Normas de Biossegurança	30
3.6. Análise Estatística	30
4. RESULTADOS	31
4.1. Amostras do parasito	31
4.2. Extração do DNA Genômico	32
4.3. Fragmentos de DNA de metacestódeos de <i>T. solium</i> amplificados pela RAPD	33
4.4. Dosagem protéica dos extratos salinos obtidos	39
4.5. Caracterização dos pacientes quanto a idade, sexo e procedência geográfica	40

4.6. Resultados obtidos no Teste ELISA	42
4.7. Resultados obtidos no SDS-PAGE e no Teste “Western Blotting”	48
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

RESUMO

A neurocisticercose (NC) constitui doença polimórfica, apresentando heterogeneidade da resposta imune no hospedeiro humano. Nesse estudo, o teste Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) foi utilizado com 35 “primers” na detecção de polimorfismo em metacestódeos de *Taenia solium* provenientes de cinco áreas geográficas distintas do Brasil: 1) Distrito Federal (DF), região Centro-Oeste; 2) Barreiras (BA), região nordeste e da região sudeste; 3) Bacia Hidrográfica do Rio Mosquito (norte de Minas Gerais, RM-MG), 4) São Paulo (SP) e 5) Uberaba (Minas Gerais, UB-MG). Os extratos salinos totais de metacestódeos de quatro populações (DF, BA, RM-MG e SP) foram utilizados na detecção de anticorpos IgG específicos pelo ELISA e “Western Blotting” (WB). As 157 amostras de soro de três grupos (G) de indivíduos: G1: 49 pacientes com NC; G2: 68 pacientes com outras helmintíases, sendo hidatidose (10), teníase (20), estrogiloidíase (20), esquistossomose (10) e himenolepíase (8) e G3: 40 indivíduos saudáveis (controles); foram analisadas pelo ELISA. Foram ensaiadas 98 amostras de soro: G1 (49), G2 (39) e G3 (10) pelo WB. As distâncias genéticas, por porcentagem de desacordo, foram de 49,5% (DF), 48% (BA), 38,5% (UB-MG) e 28% (RM-MG e SP) nas populações de metacestódeos, calculadas a partir de 15 marcadores de RAPD. Seis “primers” geraram fragmentos polimórficos nos isolados analisados, sendo que os “primers” 26 (GGGTTTGGCA) e 29 (TCGCCAGCCA) permitiram melhor diferenciação entre as populações, o “primer” 26 gerou os fragmentos de 1000, 500 e 326 pb (pares de bases) na amostra de UB-MG, e de 600 e 244 pb em RM-MG. O 29 gerou fragmentos em quatro das populações analisadas, sendo 500, 800 e 1191 pb em SP, 300 e 1377 pb em UB-MG, 1000 pb no DF e 244 e 434 pb na BA. No G1, as frequências de positividade no ELISA, foram: 90% (DF), 69% (BA), 71% (MG) e 67% (SP), sendo o extrato do DF mais antigênico que os demais ($p = 0,02$). No WB, o peptídeo de 64-68 kDa foi reconhecido em todos os extratos, exclusivamente, em amostras de pacientes com NC ativa ($p=0,001$). Detectou-se variação no padrão de reconhecimento de bandas entre os extratos ($p<0,05$). No G2, as amostras de soro de pacientes com hidatidose apresentaram de 70 a 90% de positividade no ELISA frente aos extratos analisados ($p<0,05$); porém, o padrão de reconhecimento de bandas no WB diferiu do apresentado pelas amostras do G1, sendo que a banda de 77 kDa foi significativamente identificada pelas amostras de pacientes com hidatidose ($p=0,0001$). Concluiu-se que as populações de *T. solium* analisadas nesse estudo, apresentaram variabilidade genética e diferenças de antigenicidade.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) is a polymorphic disease and the immune response in human carrier is heterogenic. In this study, 35 primers were used for amplifications by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of *Taenia solium* metacestodes, from five different geographic areas in Brazil: 1) Distrito Federal (DF), Center West; 2) Barreiras (BA), Northeast and Southeast; 3) Hydro Basin of the Mosquito River (North of Minas Gerais, RM-MG), 4) São Paulo (SP) and 5) Uberaba (Minas Gerais, UB-MG). Metacestodes saline crude extracts of four populations (DF, BA, RM-MG e SP) were used for the detection of specific IgG antibodies by ELISA and Western Blotting (WB). A total of 157 serum samples of three groups, (G1): 49 NC patients; (G2): 68 patients with other helminthiasis: hydatidosis (10), taeniasis (20), strongyloidiasis (20), schistosomiasis (10) and hymenolepiasis (8); and (G3): 40 healthy individuals; were analyzed by ELISA. From these, the 98 serum samples were assayed by WB; G1 (49), G2 (39) and G3 (10). The genetic distances, in disagreement percentage, between the metacestode populations were calculated from of 15 RAPD markers and showed 49.5% (DF), 48% (BA), 38.5% (UB-MG) and 28% (RM-MG and SP) of genetic distances. Six primers identified polymorphic fragments and the primers 26 (GGGTTTGGCA) and 29 (TCGCCAGCCA) allowed a better differentiation of populations. The fragments of 1000, 500 and 326 pb (pairs of bases) in the UB-MG and of 600 and 244 pb in RM-MG were amplified by primer 26. The fragments generated by primer 29 were 500, 800 and 1191 pb, 300 and 1377 pb, 1000 pb and 244 and 434 pb in SP, UB-MG, DF and BA populations, respectively. In G1, the positivity by ELISA was: 90% (DF), 69% (BA), 71% (MG) and 67% (SP). The DF extract was more antigenic than others ($p=0.02$). In WB, the 64-68 kDa antigens were recognized in all extracts, exclusively, in serum samples from active NC patients ($p=0.001$). Variation in banding pattern was detected between the extracts ($p<0.05$). In G2, the serum samples of hydatidosis patients presented from 70 to 90% positivity by ELISA in antigenic extracts ($p<0.05$); however, the bands recognition pattern in WB was different from that presented in G1 samples. The 77 kDa band was significantly identified in hydatidosis samples ($p=0.0001$). In conclusion, the *T. solium* populations analyzed showed genetic variability and antigenic differences.