



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**



Vanessa da Silva Ribeiro

Seleção, caracterização e aplicação de anticorpos scFv (*single chain variable fragment*) na captura de antígenos para o sorodiagnóstico da neurocisticercose humana.

Uberlândia – MG

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS**



Vanessa da Silva Ribeiro

Seleção, caracterização e aplicação de anticorpos scFv (*single chain variable fragment*) na captura de antígenos para o sorodiagnóstico da neurocisticercose humana.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
Co- Orientador

Uberlândia – MG

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

-
- R484s
2012 Ribeiro, Vanessa da Silva, 1985-
 Seleção, caracterização e aplicação de anticorpos scFv (*Single chain variable fragment*) na captura de antígenos para o sorodiagnóstico da neurocisticercose humana / Vanessa da Silva Ribeiro. – 2012.
 86 f. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa-Cruz.
Co-orientador: Luiz Ricardo Goulart.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Parasitologia - Teses. 2. Cisticercose cerebrospectral - Teses. 3. Anticorpos - Teses. 4. *Taenia solium* - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 576.8

DEDICATÓRIA

À Deus,

Por ter me dado forças para seguir em frente e superar os obstáculos.

Aos meus pais,

Antônio Ribeiro Pereira e Cleuza Ferreira da Silva Ribeiro pelo amor e apoio incondicional e pela compreensão nos momentos de ausência.

À minhas irmãs,

Rita de Kássia Ribeiro e Érika da Silva Ribeiro pelo carinho e apoio.

Ao meu marido,

Rogério de Araújo pelo incentivo constante mesmo a distância e pelo ombro amigo que me amparou e não me deixou desistir.

“Todo tempo é bom quando nos ocupamos em superar o que sabemos”

Livro do Senhor de Sandara (Logosofia)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz pelo exemplo de profissional ética, pela confiança depositada e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart por disponibilizar toda estrutura do Laboratório de Nanobiotecnologia para execução deste estudo, por acreditar neste projeto e me incentivar constantemente.

Aos amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses: Ana Lúcia Gonçalves Ribeiro, Daniela da Silva Nunes, Henrique Tomaz Gonzaga, Marianna Nascimento Manhani e Nagilla Daliane Feliciano pelos anos de alegre convivência. Agradeço especialmente à Daniela e Henrique pela parceria bastante produtiva estabelecida e pela imensa colaboração na fase final deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia que se mostraram sempre prestativos e me receberam de braços abertos. Em especial agradeço à Rafael Nascimento, pelo sequenciamento das proteínas e anticorpos e Thaise Gonçalves de Araújo pelo companheirismo nas madrugadas e finais de semana de experimento e pela importante e fundamental participação na obtenção dos anticorpos.

Aos funcionários da área de Parasitologia, especialmente a Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, pela convivência agradável e pela presteza.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela colaboração em minha formação.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
2D	Bidimensional
AUC	<i>Área under curve</i>
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	3,3 de diaminobenzidina
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EITB	<i>Electro-immuno transfer blotting</i>
Es	Especificidade
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	Hormônio folículo estimulante
Grupo 1	Pacientes com diagnóstico definitivo de NC
Grupo 2	Pacientes infectados por outros parasitos
Grupo 3	Indivíduos aparentemente saudáveis
H ₂ O ₂	Peróxido de Oxigênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HA	Hemaglutinina influenza humana
HCL	Ácido clorídrico
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HPJ	Método de Hoffmann, Pons e Janer
IE	Índice ELISA
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN γ	Interferon Gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina

IPTG	Isopropil b-D-thiogalactopiranoside
IR	Índice de Reatividade
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
LB	Luria Bertani
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LR	<i>Likelihood ratio</i>
M	Molar
MAPIA	<i>multi antigen printing immunoassay</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimethithiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide
N	Normal
NaCl	Cloreto de Sódio
NC	Neurocisticercose
NC ₂ 2	Peptídeo exposto em fago selecionado por Ribeiro (2009)
NC ₄ 1	Peptídeo exposto em fago selecionado por Ribeiro (2009)
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	Ortofenilenodiamina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS acrescido de Tween 20
PBST M	PBS acrescido de Tween 20 e leite desnatado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placa
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIII	Proteína III do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pIX	Proteína IX do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVI	Proteína VI do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVII	Proteína VII do capsídio de bacteriófagos filamentosos
pVIII	Proteína VIII do capsídio de bacteriófagos filamentosos

RFC	Reação de Fixação de Complemento
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucléico
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
rpm	Rotações por minuto
S	Extrato Salino Total de Metacestódeos de <i>Taenia solium</i>
SB	<i>Superbroth</i>
scFv	<i>Single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Se	Sensibilidade
sICAM	Molécula de adesão intercelular solúvel
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura ambiente
TBST	Solução salina tamponada com Tris acrescido de Twen 20
TC	Tomografia Computadorizada
TG-ROC	<i>Two graphic receiver operating characteristic</i>
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Tris HCl	Tris acrescido de ácido clorídrico
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
VH	Cadeia pesada
VL	Cadeia leve
WB	<i>Western blotting</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do bacteriófago M13. Fonte Universidad Complutense de Madrid http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromovibac/cromovibac.htm).....	27
Figura 2 - Esquema da estrutura do bacteriófago M13 carregando o fragmento de anticopos scFV (Ahmad et al., 2012).....	29
Figura 3 - Esquema da estrutura do anticorpo IgG completo demonstrando a porção F(ab') ₂ , Fab e a menor porção funcional de um anticorpo, scFv (www.aapsj.org).....	29
Figura 4 – Esquema da captura de antígenos, cada clone foi utilizado para capturar antígenos a partir do extrato salino total e da fração DEAE S2.....	46
Figura 5 – Análise da extração do DNA plasmidial das bactérias do 2º ciclo de seleção em gel de agarose 0,8%.....	50
Figura 6 – Transformação da linhagem de <i>E. coli</i> não supressora Top 10 com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção.....	50
Figura 7 - ELISA de sobrenadante de cultura dos clones induzidos com IPTG após transformação em <i>E. coli</i> linhagem TOP 10.....	51
Figura 8 - Análise de <i>dot blot</i> do sobrenadante de cultura dos clones induzidos com IPTG.....	51
Figura 9 – ELISA para análise da reatividade dos scFvs selecionados. As colunas com linhas horizontais representam a reatividade dos clones ao alvo. A- Clones selecionados contra o fago NC ₂₂ , B – NC ₄₁ e C – antígeno salino total de metacésteos de <i>T. solium</i> . As colunas em branco representam reatividade dos clones ao fago selvagem (A, B) e PBS-BSA 3% (C).....	53
Figura 10 - Análise do perfil eletroforético dos clones selecionados em SDS-PAGE 16% (A) e por <i>western blotting</i> , o clone purificado por cromatografia foi reconhecido pelo anticorpo anti-HA (marcado com peroxidase) na posição de aproximadamente 29 kDa(B).....	54
Figura 11 - Verificação da especificidade dos clones selecionados ao alvo 1- Antígeno total, 2 (A e B) - PBS, C-F (peptídeo exposto em fago), 3 (C-F) – Fago selvagem. scFvs: A2 (A), A4 (B), B6 (C), E4 (D), G10 (E), H12 (F).....	55
Figura 12 – Imunofluorescência do cisticerco de <i>T. solium</i> para imunolocalização dos antígenos reconhecidos por cada clone de scFv selecionado. A ligação foi observada pela utilização de anti HA marcado com FITC, por microscopia de fluorescência (A) negativo, (B) B6, (C) A4 e (D) G10.....	56

Figura 13- Perfil eletroforético em SDS-PAGE 16% (corado por nitrato de prata) dos antígenos capturados a partir do antígeno salino total de metacestódeos de <i>T. solium</i> pelos clones B6 (A), G10 (B) e A4 (C).....	58
Figura 14 - Perfis eletroforéticos do extrato salino total de formas metacestódeas de <i>T. solium</i> (S) e frações obtidas, em resina sepharose dietilaminoetil – DEAE (DEAE S1 e a DEAE S2, a qual interagiu com a resina), em SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).....	59
Figura 15 - Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> em amostras de soros de pacientes com NC (G1; n = 40), outras parasitoses (G2; n = 40) e indivíduos saudáveis (G3; n = 40) analisadas por ELISA, utilizando o extrato salino total (S) de <i>T. solium</i> , e suas frações DEAE S1 (que não interagiu com a resina) e DEAE S2 (que interagiu com a resina). Linha pontilhada indica o índice reatividade (IR); linha contínua refere-se à mediana do grupo.	60
Figura 16 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (<i>cut-off</i>), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (<i>área under curve</i> ; AUC) e razão de probabilidade (<i>likelihood ratio</i> ; LR) para extrato salino total (S) e suas frações DEAE S1 e DEAE S2 na detecção de IgG em amostras de soro.....	61
Figura 17 - Perfis eletroforéticos por SDS PAGE 16% e análise dos mesmos pelo programa Image J do extrato salino total de formas metacestódeas (S) e frações obtidas após captura antigênica pelos clones A4, B6 e G10 em SDS-PAGE, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).....	62
Figura 18 - Perfis eletroforéticos por SDS PAGE 12% e análise dos mesmos pelo programa Image J da fração DEAE S2 e frações obtidas após captura antigênica pelos clones A4, B6 e G10 em SDS-PAGE, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).....	62
Figura 19 - Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> em amostras de soros de pacientes com NC (G1; n = 30), outras parasitoses (G2; n = 30) e indivíduos saudáveis (G3; n = 30) analisadas por ELISA. A= Amostras testadas utilizando extrato salino total (S) de <i>T. solium</i> e os antígenos capturados pelos clones G10, A4 e B6. B= Amostras testadas utilizando fração DEAE S2 e os antígenos capturados pelos clones G10, A4 e B6. Linha pontilhada indica o índice reatividade (IR); linha contínua refere-se à mediana do grupo.....	63
Figura 20 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (<i>cut-off</i>), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (<i>área under curve</i> ; AUC) e razão de probabilidade (<i>likelihood ratio</i> ; LR) para extrato salino total (S) (A) e os antígenos capturados a partir dele pelos clones G10 (B), A4 (C) e B6 (D) na detecção de IgG em amostras de soro.....	65

Figura 21 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (<i>cut-off</i>), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (<i>área under curve</i> ; AUC) e razão de probabilidade (<i>likelihood ratio</i> ; LR) para a fração DEAE S2 (A) e os antígenos capturados a partir dele pelos clones G10 (B), A4 (C) e B6 (D) na detecção de IgG em amostras de soro.....	66
Figura 22 - <i>Western Blotting</i> utilizando <i>pool</i> de amostras de soro de pacientes com NC frente às frações antigênicas capturadas a partir do extrato salino total das formas metacestódeas de <i>T. solium</i> (S) analisadas pelo programa Image J. Foram utilizados os clones A4, B6 e G10.....	67
Figura 23 - <i>Western Blotting</i> utilizando <i>pool</i> de amostras de soro de pacientes com NC frente às frações antigênicas capturadas a partir da fração DEAE S2, analisadas pelo programa Image J. Foram utilizados os clones A4, B6 e G10.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Títulos obtidos nos dois ciclos de seleção de uma biblioteca scFv expressa em fagos contra antígeno total de metacestódeos de <i>T. solium</i> (S) e dois peptídeos expressos em fagos (NC22 e NC41). Títulos de entrada e saída, as condições de estringência nas lavagens são mostradas para cada ciclo. Ufc/mL = unidades formadoras de colônias por mL.....	49
Tabela 2 – Sequência dos anticorpos selecionados. Os frameworks (1 a 3) encontram-se sublinhados.....	57
Tabela 3 – Dados do sequenciamento por LC MS/MS. São mostradas as proteínas alvo de cada clone, ou seja, o antígeno verdadeiro.....	58

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT	15
1 – INTRODUÇÃO	16
1.1 – Ciclo biológico e morfologia	16
1.2 – Aspectos epidemiológicos	17
1.3- Relação parasito hospedeiro	20
1.3.1 – Ação patogênica e resposta imune	20
1.3.2 – Sintomatologia	22
1.4 – Diagnóstico	23
1.4.1 – Neuroimagem	24
1.4.2 – Imunodiagnóstico	24
1.5 - <i>Phage Display</i>	26
1.6 – Utilização de fragmentos de anticorpos expostos em fagos – scFv	28
2 – OBJETIVOS	31
3 – MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 - Aspectos éticos	32
3.2 - Obtenção das formas metacestódeas de <i>T. solium</i>	32
3.3 - Preparo do extrato salino (S) total de metacestódeos de <i>T. solium</i>	32
3.4 – Preparo do fago auxiliar VCSM13	32
3.4.1 – Obtenção das placas de lise	33
3.4.2 – Amplificação das placas de lise.....	33
3.4.3 – Determinação do título da preparação de fagos auxiliares.....	33
3.5 – Biblioteca de fragmentos de anticorpos expostos em fagos – scFv	34
3.6 – Reamplificação da biblioteca scFv	34
3.7 – Acoplamento de fagos a <i>beads epoxy</i>	35
3.8 – Seleção de anticorpos recombinantes scFv	35
3.9 – Preparação do DNA plasmidial	36
3.10 – Transformação da linhagem de <i>E. coli</i> não supressora Top 10 com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção.....	37
3.11 – Produção de scFv na forma solúvel em placa <i>deep well</i>	37
3.12 – Teste ELISA para análise da expressão heteróloga de moléculas de scFv	38
3.13 – <i>Dot blot</i> para análise da expressão heteróloga de moléculas de scFv.....	38

3.14 – Análise dos fragmentos de anticorpos selecionados por ELISA – <i>Pré screening</i>	39
3.15 – Produção de scFv em maior escala.....	40
3.16 – Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC	40
3.17 – Análise em gel SDS-PAGE e western blotting (WB).....	40
3.18 – <i>Dot blot</i>	41
3.19 – Imunofluorescência	41
3.20 – Sequenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones	41
3.21 - Captura de antígenos a partir do extrato salino total.....	42
3.22 - Sequenciamento das proteínas capturadas	42
3.22.1 – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas LC-MS/MS.....	43
3.22.2 – Análise dos dados de espectrometria de massas.....	43
3.23 - Fracionamento do antígeno total de metacestódeos de <i>T. solium</i> por cromatografia de troca iônica	43
3.24 - ELISA para seleção da fração com melhores parâmetros diagnósticos.....	44
3.24.1 - Amostras de soro	44
3.24.1.1 – Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose (Grupo 1)	44
3.24.1.2 – Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo <i>Taenia</i> sp. (Grupo 2)	45
3.24.1.3 – Amostras de soro controle de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3)	45
3.24.1.4 – ELISA com as frações resultantes do fracionamento por troca iônica	45
3.25 – Captura de novos antígenos	46
3.26 – ELISA com os antígenos capturados	46
3.27 – <i>Western blotting</i> com os antígenos capturados.....	47
3.28- Análise estatística	47
4 – RESULTADOS	49
4.1 – Seleção dos anticorpos.....	49
4.2 - Transformação da linhagem de <i>Escherichia coli</i> com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção e expressão de moléculas scFv em solução	49
4.3 - ELISA para seleção dos fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade aos alvos	52
4.4 - Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC e análise das frações eluídas	54

4.5 - Localização por imunofluorescência dos antígenos reconhecidos pelos clones selecionados	55
4.6 - Sequenciamento dos clones selecionados	57
4.7 – Caracterização dos antígenos verdadeiros	57
4.8 – Fracionamento do extrato salino total por cromatografia de troca iônica...	58
4.9- Captura de novos antígenos e aplicação na detecção de IgG em amostras de soro	61
5 – DISCUSSÃO	68
6 – CONCLUSÕES	73
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

RESUMO

A neurocisticercose humana (NC) é uma doença muito importante, porém negligenciada e é a maior causa de epilepsia em países em desenvolvimento onde a parasitose ocorre. A expressão de fragmentos de cadeia única das regiões variáveis de anticorpo (scFv) na superfície de bacteriófagos é amplamente utilizada para obter anticorpos com especificidades pré-definidas. Uma biblioteca de anticorpos foi utilizada para a seleção de clones específicos à peptídeos expostos em fagos acoplados a *beads* e ao extrato salino total de *Taenia solium* (S) imobilizado em placas de microtitulação. Após dois ciclos de seleção, 96 clones de anticorpos foram selecionados contra cada alvo, testados para expressão do scFv e especificidade pelo alvo. Aqueles clones que se mostraram específicos foram melhor analisados por ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*), *Dot blot*, sequenciamento e imunofluorescência. Três clones foram selecionados para serem utilizados na captura antigênica e caracterização do antígeno verdadeiro e para captura de novos antígenos com potencial aplicação em testes diagnósticos. O extrato S foi fracionado em resina de troca iônica diethylaminoethyl (DEAE) para obter frações que foram posteriormente testadas por ELISA para detectar IgG em amostras de soro de pacientes: com NC, outras parasitoses e saudáveis, 40 amostras cada grupo. A fração com melhores parâmetros diagnósticos (sensibilidade, especificidade, área sob a curva e *likelihood ratio*, calculadas por TG-ROC) foi selecionada e sujeita à captura antigênica usando cada clone de scFv purificado. Cada fração capturada foi testada por ELISA para detectar IgG em 30 amostras de soro de cada grupo. Nos testes de imunofluorescência, nenhuma fluorescência foi observada com os controles negativos e todos os clones mostraram um padrão de marcação não uniforme, seus antígenos alvo foram elucidados por espectrometria de massas. Após fracionamento por troca iônica e ELISA, a fração DEAE S2 se mostrou a melhor e foi utilizada para a captura de novos antígenos. A fração DEAE S2 mostrou especificidade de 93,3%. Dentre todos os clones, o A4 e o B6 capturaram antígenos do extrato S e fração DEAE S2, respectivamente, com os melhores parâmetros diagnósticos. Em conclusão a tecnologia de exposição de anticorpos em fagos é uma técnica potencial para o estudo de interações antígeno-anticorpo utilizadas para melhor elucidar a biologia da interação na NC e para capturar novos antígenos potencialmente aplicáveis para o diagnóstico da NC.

Palavras-chave: Neurocisticercose; anticorpos scFv, *phage display*, *Taenia solium*; diagnóstico

ABSTRACT

Selection, characterization and application of scFv antibodies (*single chain variable fragment*) to capture antigens for human neurocysticercosis serodiagnosis.

Human neurocysticercosis (NC) is an important but neglected cause of epilepsy in developing countries where the parasite occurs. Expression of single-chain variable fragment (scFv) antibodies on the surface of bacteriophage is widely used to prepare antibodies with pre-defined specificities. A phage antibody library was selected against peptides displayed on phages coupled to beads and total saline extract of *Taenia solium* metacestodes immobilized on microtiter plate wells. After two rounds of selection 96 phage clones of each panning were selected, tested for scFv expression and specificity to each target. Specific clones were further analyzed by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), Dot-blot, sequencing and immunofluorescence. After selection, three clones were used for antigen capture to characterize its targets for future immunodiagnostic assays development. Total saline extract was fractionated on ion exchange resin diethylaminoethyl (DEAE), and fractions were tested by ELISA to detect sera IgG from: NC, other parasites and health controls (40 each). The fractions with best diagnostic parameters (sensitivity, specificity, area under curve and likelihood ratio, calculated by TG-ROC) were selected and subjected to antigen capture using each purified scFv clone. Each captured fraction was tested by ELISA to detect IgG in 30 serum samples from each group. In immunofluorescence tests, no fluorescence was observed in negative controls, and all clones showed a non-uniform staining profile, and their targets were elucidated through mass spectrometry. After ion exchange fractionation and ELISA tests, DEAE S2 fraction showed to be the best one and was used to capture new antigens. DEAE S2 showed 93.3% specificity. Among all clones, A4 and B6 captured antigens from saline extract and DEAE S2 fraction, respectively, with the best diagnostic parameters. In conclusion, antibody phage display technology is a potential approach for the study of antigen-antibody interactions, which can be used to further elucidate the biology of interaction on neurocysticercosis and to capture new antigens with potential applications in NC diagnosis and therapeutics.

Keywords: Neurocysticercosis; scFv antibodies, phage display, *Taenia solium*; diagnosis

1 – INTRODUÇÃO

Teníase e cisticercose são doenças causadas por parasitos do gênero *Taenia* e têm distribuição mundial principalmente onde as condições sanitárias são precárias, ocorrendo também em países mais desenvolvidos devido à migração de indivíduos provenientes de áreas endêmicas (CARPIO, 2002).

A teníase é provocada pelo estágio adulto de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758), ou *Taenia saginata* (Goeze, 1782) cujo habitat é o intestino delgado do homem. A espécie *T. solium* é universalmente aceita como a única a ocasionar a cisticercose humana, causada pela ingestão de ovos deste parasito. Neste caso as formas metacestódeas podem acometer diversos órgãos e tecidos, tais como: olhos, músculos e sistema nervoso central (SNC) (GARCIA; DEL BRUTTO, 2000).

Quando as formas metacestódeas de *T. solium* alcançam o sistema nervoso central causam a neurocisticercose (NC), principal causa de epilepsia no mundo, com altos níveis de morbidade, e que em certos casos leva à morte. A presença destas formas no SNC resulta em vários sintomas incluindo dano local e inflamação, compressão, bloqueio do fluxo de liquor (LCR) e vasculite (MAHANTY; GARCIA, 2010).

1.1 – Ciclo biológico e morfologia

A cisticercose é reconhecida desde os mais remotos tempos; porém somente em 1855 teve seu ciclo esclarecido por Friedrich Küchenmeister. Em um ensaio, metacestódeos foram adicionados na dieta alimentar de prisioneiros condenados e após a necropsia dos mesmos meses mais tarde, tênias foram observadas no intestino da maioria deles. Desta maneira, definiu que o ciclo biológico implica em dois hospedeiros, ou seja, é heteroxeno. (GARCIA et al., 2003a; HAWK et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

Na teníase, humanos se infectam pela ingestão de formas metacestódeas presentes em carne suína ou bovina mal cozida. As formas metacestódeas (0,5-1 cm de diâmetro) são preenchidas com um fluido claro e são compostas de uma membrana vesicular que internamente possui um escólex invaginado. Com o estímulo das enzimas digestivas, o escólex invagina e se fixa na mucosa do intestino delgado por meio de ventosas e acúleos. Divisões celulares ocorrem ao nível do colo e inicia-se a formação das proglotes (MAHANTY; GARCIA, 2010). O tenídeo completamente desenvolvido mede de 2 a 4 metros de comprimento, possui escólex piriforme com quatro ventosas além de uma dupla

coroa de acúleos, o estróbilo corresponde ao restante do parasito e possui aspecto de fita sendo composto por um grande número de segmentos, as proglotes, que apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas. Cada proglote madura contém sistemas reprodutores feminino e masculino e após 2 a 3 meses da infecção inicia-se a autofecundação com a produção de ovos. As próglotes grávidas, na extremidade posterior são completamente ocupadas pelo útero cheio de ovos. Os ovos de aspecto radial medem cerca de 10 µm e são envoltos por uma espessa membrana protetora denominada embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto com três pares de acúleos, estes são liberados para o ambiente com as fezes do portador de teníase.

Suínos e humanos adquirem a cisticercose quando ingerem alimentos ou água contaminados com fezes contendo ovos de *T. solium*. O embrióforo dos ovos é rompido graças à ação dos ácidos estomacais e enzimas intestinais, as oncosferas são ativadas e se fixam à mucosa intestinal, esta fixação parece envolver os prolongamentos da membrana da oncosfera (VERASTEGUI et al., 2007). Uma vez fixadas as oncosferas atravessam ativamente a mucosa por movimentos ativos e secreção de proteases (BAIG et al., 2006). Elas alcançam a submucosa chegando ao sistema circulatório através do qual são disseminadas pelo organismo. Uma vez no vaso terminal o embrião se estabelece e começa a crescer e se desenvolver em forma metacestódea (MAHANTY; GARCIA, 2010).

Aparentemente vários embriões são destruídos durante o processo, com uma taxa de estabelecimento de aproximadamente 2%, em infecções experimentais (FLISSER, 1994).

A forma larvária (metacestódea) pode atingir os mais variados tecidos, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, cavidade oral e SNC (LIMA et al., 2004; PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005).

1.2- Aspectos epidemiológicos

A cisticercose é um sério problema de saúde pública na América Latina, Sudeste Asiático, Índia, Nepal, China e em vários países da África (KANOBANA et al., 2011; SINGHI, 2011). Contudo, com a crescente globalização a prevalência tem aumentado em países desenvolvidos como Estados Unidos, Reino Unido e vários países europeus devido ao aumento de viagens às áreas endêmicas para a doença e pela imigração de portadores da tênia (BURNEO et al., 2009; SINGHI, 2011).

A cisticercose representa um problema crescente, especialmente em áreas rurais, onde a inspeção de carne é inapropriada ou inexistente e a falta de educação sanitária e de higiene

são comuns (WINKLER et al., 2009). Os custos em decorrência da cisticercose são consideráveis e estimou-se perda de 34,2 milhões de dólares com a doença na província de Eastern Cape na África do Sul, com 7 milhões de habitantes em 2004 (CARABIN et al., 2006). Quando se avaliou o impacto com internações os valores excederam 17 milhões de dólares na Califórnia, de acordo com Crocker et al. (2012).

Em países não endêmicos o risco de cisticercose é associado com o contato próximo entre residentes e imigrantes, portadores da tênia adulta, empregados como trabalhadores domésticos (SCHANTZ et al., 1992). Na Califórnia foi demonstrada uma incidência de 0,8 por 100.000 casos, sendo os acometidos principalmente latinos (84,9%) e na maioria homens (57,6%) com idade média de 43,5 anos (CROCKER et al., 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose acomete 50.000.000 de indivíduos em todo mundo provocando aproximadamente 50.000 óbitos anualmente (MAFOJANE et al., 2003).

Na América Latina, calcula-se que a taxa de prevalência de NC e lesões oculares seja entre 30 e 100 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, atingindo cerca de 350.000 pessoas (PINTO et al., 2002). A enfermidade foi encontrada em 17 países latino-americanos, sendo prevalente na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guatemala, México e no Peru. O complexo teníase-cisticercose constitui um problema na Argentina, Chile, Costa Rica, Haiti, Panamá, República Dominicana e na Venezuela, mas a transmissão é esporádica. Em alguns países deste continente são registrados apenas casos importados, como no caso do Canadá, Cuba, Guiana Francesa, Jamaica, Paraguai, Suriname e Trinidad e Tobago (ANTONIUK, 1999).

Em estudo recente Kanobana et al. (2011) verificaram a existência de um foco endêmico na República Democrática do Congo com a presença de infecção por cisticercos viáveis em 20% da população, demonstrando alta prevalência se comparada com observações feitas em outras partes do mundo.

A magnitude da NC foi evidenciada pela Tomografia Computadorizada (TC), esta técnica foi a responsável pelo reconhecimento da ocorrência endêmica desta condição em diversas áreas do Brasil, não existindo nenhuma região da Federação livre deste problema (AGAPEJEV, 2003).

O levantamento realizado por Agapejev (2003) para avaliar a incidência de cisticercose no Brasil mostrou que: a incidência de NC é em geral 5 vezes mais elevada na população psiquiátrica, a população indígena apresenta incidência sorológica 18 vezes maior que em

outras populações. Neste estudo verificou-se que o paciente com NC necessita de 1-3 internações por período de 1-2 semanas e a letalidade gira em torno de 15%.

A NC tem sido apresentada com frequência nos estados do sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, principalmente em indivíduos dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás, o gênero feminino foi o mais acometido (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; BRAGAZZA et al., 2002; AGAPEJEV 2003; MENDES et al., 2005; BENEDETTI, FALAVIGNA; FALAVIGNA-GUILHERME, 2007), porém dois levantamentos atuais demonstraram a maior incidência em homens que mulheres (ALMEIDA; TORRES, 2011; CROCKER et al., 2012).

Exclusivamente nos hospitais, a frequência observada de NC é 1,94 a 2,03%, mostrando o menor valor (0,19%) no estado de São Paulo e o maior (4,8%) no estado do Paraná. Em hospitais psiquiátricos do estado de Minas Gerais, a frequência de NC corresponde a 12,2% (AGAPEJEV, 2003).

Na região do Triângulo Mineiro, Costa-Cruz et al. (1995) verificaram a ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas no período de 1971 a 1993 em Uberlândia-MG e detectaram prevalência de 1,4%, sendo a localização mais frequente o SNC. Gobbi et al. (1980) relataram que em 2.306 necropsias realizadas em indivíduos falecidos em Uberaba-MG foram encontrados 2,4% de casos de cisticercose e destes 66% foram de NC.

Um estudo realizado por Silveira-Lacerda et al. (2002) em quatro cidades do Triângulo Mineiro constatou a soroprevalência da cisticercose em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre de Minas (4,8%) e Uberlândia (4,7%), demonstrando assim a endemicidade da cisticercose na população amostrada e a problemática do complexo teníase-cisticercose na região.

Os mecanismos de transmissão da cisticercose homem-suíno, homem-homem têm como fator primordial as condições sócio-econômicas e culturais do ser humano, dentre essas condições destacam-se as sanitárias, como falta de higiene pessoal e de saneamento básico, com contaminação da água e de alimentos com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta do parasito (FLISSER et al., 2003; GARCIA et al., 2003b; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003).

Outro fator importante para manter a endemia de cisticercose numa dada região é o sistema primitivo de criação de suínos, onde há o contato destes animais com fezes humanas mantendo o ciclo de vida de *T. solium*. Esse fator, aliado ao hábito de ingestão de carne suína mal-cozida aumenta a prevalência da teníase estritamente relacionada com a cisticercose (SCIUTTO et al., 2000; HOBBERG, 2002). Um estudo no sul da África apontou

prevalência de 64,4% de *T. solium* em suínos, reafirmando o papel deste animal na manutenção da parasitose (KRECEK et al., 2008).

Crianças são menos acometidas, presumivelmente devido a seu menor tempo de exposição e/ou diferenças na responsividade imune. Não há diferenças significativas na prevalência devido ao gênero ou fatores genéticos. Há algumas indicações de que mulheres apresentam com maior frequência a forma encefalítica da doença (DEL BRUTTO, SOTELO, ROMAN, 1998).

1.3 - Relação parasito – hospedeiro

Estudos em modelos experimentais têm investigado os mecanismos da resposta imune provocados contra a forma metacestódea de *T. solium*, apresentando claramente heterogeneidade da resposta imune humoral, existência de mecanismos evasivos e o fato que a resposta imune pode proteger ou prejudicar o hospedeiro (CARPIO, 2002).

1.3.1 - Ação patogênica e resposta imune

O sistema imune do hospedeiro humano reconhece e produz uma resposta contra *T. solium*. Na maioria dos casos (80%), níveis detectáveis de anticorpos contra antígenos do parasito são encontrados em várias quantidades no soro e LCR (CORREA et al., 1989).

Na resposta humoral, há predominância de imunoglobulina G (IgG), há relatos na literatura em que os níveis de IgG podem estar relacionados diretamente com a concentração de antígeno circulante, os níveis desta imunoglobulina aumentam com o aumento no número de cisticercos (PRABHAKARAN et al., 2010).

O cisticerco passa por vários estágios: vesicular – fase inicial quando cisticercos viáveis têm uma inflamação mínima associada; coloidal - com a perda da habilidade de controle da resposta imune do hospedeiro pelo cisticerco, sua parede é infiltrada e rodeada por células inflamatórias do hospedeiro, compostas primariamente por células mononucleares, que também podem entrar no fluido do cisticerco; granular nodular - ocorre colapso de sua cavidade e fibrose devido ao progresso da resposta imune; estágio calcificado - eventualmente o parasito é substituído por fibrose progressiva e os tecidos inflamatórios são substituídos por estruturas de colágeno levando à calcificação (WHITE Jr, 2000).

A constante liberação e persistência de glicoproteínas do parasito durante o curso da NC levam a um ambiente supressor e imunorregulatório que suporta o estabelecimento do

parasito e sua manutenção com minimização dos danos por resposta inflamatória. Quando pacientes são tratados com drogas anti-helmínticas o parasito morre é desencadeada a reação inflamatória (ALVAREZ, RIVERA, TEALE, 2008).

Cisticercos viáveis raramente causam manifestações clínicas aparentes, os sintomas aparecem com a degeneração (WHITE Jr, 1997), que torna o líquido vesicular disponível para o sistema imune, induzindo uma resposta Th1 (PRASAD et al., 2006).

A forma metacestódea pode persistir por longos períodos, em muitos casos por anos, devido à ação de seus produtos de excreção e secreção, que modulam a resposta imune do hospedeiro sem licitar uma reação inflamatória. A ausência ou redução da inflamação é resultado da secreção de serino proteases, que inibem a ativação do complemento (SCIUTTO et al., 2007; WANG et al., 2008).

Foi demonstrado através da dosagem de citocinas em amostras de soro que durante a NC sintomática os níveis de IL-10, IL-4, IFN- α , TNF- γ , IL-17, IL-23 e sICAM-1 estavam significativamente elevados se comparados com os controles saudáveis. A frequência de PBMCs expressando maior quantidade de TLR4 e monócitos foi observada em ambos os grupos de pacientes com NC (sintomáticos e assintomáticos), os maiores níveis de TLR4 nos pacientes sintomáticos se correlaciona com o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (VERMA et al., 2010).

Estudos *in vitro* e *in vivo* verificaram o estabelecimento de uma forte resposta Th1 na NC sintomática enquanto que na NC assintomática prevalece a resposta Th2 (PRASAD et al., 2009). Na NC ativa há um foco inflamatório ao redor do cisticerco, o aparecimento de inflamação e granuloma na NC têm sido atribuídos predominantemente a uma resposta Th1 (RESTREPO et al., 2001).

No LCR há níveis aumentados de IL-5, IL-6 e IL-10 em pacientes sintomáticos (RODRIGUES et al., 2000; CHAVARRIA et al., 2006). Cisticercos calcificados levam ao aumento de citocinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 no sobrenadante de PBMCs estimulados com antígenos do cisticerco (CHAVARRIA et al., 2003). Em contraste na NC grave, a neuroinflamação gerada por uma mistura de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 α , IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12) está associado com a baixa resposta proliferativa dos PBMCs, que por sua vez está associada com níveis aumentados de TNF α (SAENZ et al., 2012).

Um estudo foi realizado para analisar o impacto da NC no *status* endócrino e sua relação nos parâmetros imuno inflamatórios. Foram verificados menores concentrações de progesterona em mulheres com sintomas graves. Em homens foram encontrados maiores

concentrações de hormônio folículo estimulante (FSH) e menores de testosterona, em pacientes clinicamente graves. Correlações significantes foram encontradas entre estradiol e IL-10 em homens e entre androstenediona e IL-17 em mulheres. Este estudo foi o primeiro a demonstrar que a presença da forma metacestódea de *T. solium* no SNC pode modificar o ambiente do hospedeiro pela indução de mudanças endócrinas e imunológicas (CARDENAS et al., 2012).

Assim a patologia, a clínica e a resposta imunológica ao parasito estão relacionadas e dependem da localização, número, tamanho e fase de desenvolvimento em que se encontram os cisticercos e também da reação dos tecidos parasitados (WHITE Jr, 2000; DEL BRUTTO, 2005).

1.3.2 - Sintomatologia

Pacientes com NC podem permanecer assintomáticos por muitos anos ou apresentar várias manifestações neurológicas não específicas incluindo dores de cabeça, confusão, ataxia e desmaios (CARPIO, ESCOBAR; HAUSER, 1988).

Em algumas regiões endêmicas, estudos de autopsias demonstraram frequência de 43,3% a 91% de indivíduos assintomáticos com NC (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

Há muita variação nas manifestações clínicas da NC, isto se deve a inflamação ao redor dos cisticercos, que impede o fluxo de LCR (WHITE Jr, 1997). A NC sintomática resulta de uma combinação de fatores, incluindo o número, estágio e localização dos parasitos no SNC, assim como da resposta imune do hospedeiro contra o parasito (GARCIA et al., 2005).

A NC também não possui sintomatologia característica, podendo ser confundida com outras síndromes neurológicas. As manifestações clínicas mais frequentes são: crises epiléticas (62%), síndrome de hipertensão intracraniana (38%), meningite cisticercótica (35%), distúrbios psíquicos (11%), forma apoplética ou endarterítica (2,8%) e síndrome medular (0,5%) (TAKAYANAGUI, 1990). Vários sintomas como tonturas, convulsões, déficit motor, movimentos involuntários e distúrbios comportamentais (HAMED; EL-METAAL, 2007), além crises depressivas (FORLENZA et al., 1998) e cefaléia (SOUSA et al., 1998) podem ser observados.

Frequentemente pacientes com poucos cisticercos intraparenquimais permanecem assintomáticos, porém alguns desenvolvem convulsões. Por outro lado pacientes com vários

cisticercos no cérebro podem desenvolver deficiência cognitiva e convulsões incontroláveis além de encefalite (DEL BRUTTO, 2005; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006).

Os sintomas da NC parenquimal decorrem da indução de resposta inflamatória pelo cisticerco em degeneração ou calcificado. Convulsão é a manifestação mais comum, podendo ocorrer também encefalite, meningite, hipertensão intracraniana e sinais neurológicos focais (FLEURY et al., 2004). Um estudo recente demonstrou que há relação entre a presença de cisticercose calcificada com desordens primárias, como dores de cabeça (DEL BRUTTO; DEL BRUTTO, 2012).

Quando a localização do cisticerco ocorre no ventrículo (10-20% dos casos) ou nas cisternas basais pode haver hidrocefalia pelo bloqueio da circulação de LCR, sinais focais pela compressão e hipertensão intracranial secundária à hidrocefalia (FLEURY et al., 2004; YEH; WU, 2008).

Hidrocefalia e hipertensão intracraniana (25% dos casos) se devem ao edema em decorrência da resposta imunológica à forma metacestódea e se manifestam por náuseas, vômitos e dores de cabeça (WHITE Jr, 2000). Em raras ocasiões os quadros secundários a hidrocefalia podem se manifestar como parkinsonismo (LOPEZ et al., 2008).

A gravidade dos sintomas desta doença é geralmente associada com a resposta inflamatória crônica, sugerida pela persistência do antígeno, que também pode ser influenciada por glicoconjugados expressos pelos metacestódeos de *T. solium* (ALVAREZ; RIVERA; TEALE, 2008).

Um estudo recente mostrou que pacientes com NC parenquimal possuem ainda disfunções cognitivas leves juntamente com deficits significantes na qualidade de vida quando comparados com controles saudáveis ou com epilepsia. Os dados revelaram ainda que os deficits cognitivos e de qualidade de vida aumentam com o tempo (WALLIN et al., 2012).

1.4 – Diagnóstico

A NC é primariamente diagnosticada por técnicas de neuroimagem, TC ou ressonância magnética (RM) e confirmada por reações imunológicas. Exames de imagem são requeridos para determinar a característica e localização da lesão enquanto o imunodiagnóstico demonstra antígenos ou anticorpos específicos circulantes (MAHANTY; GARCIA, 2010).

Devido à grande variedade de apresentações clínicas o diagnóstico raramente é realizado unicamente pela história clínica e exame físico. O diagnóstico da NC se baseia

geralmente na combinação de dados clínicos, epidemiológicos, radiológicos e sorológicos (HAWK et al., 2005).

Os critérios (absolutos, maiores, menores e epidemiológicos) para a definição do diagnóstico da cisticercose e da NC foram estabelecidos por Del Brutto et al. (1996) e revisados por Del Brutto et al. (2001). O critério padrão ou absoluto para o diagnóstico de NC inclui (i) demonstração histológica do parasito em biópsia ou material de operação, (ii) lesões císticas mostrando o escólex por TC ou RM são patognomônicos e (iii) visualização fundoscópica do parasito em casos de cisticercose intraocular.

1.4.1 - Neuroimagem

As melhores ferramentas diagnósticas para NC são as técnicas de neuroimagem (TC ou RM). Em geral ambas são de alto custo e raramente estão disponíveis nas áreas rurais e em muitas regiões endêmicas. Quando disponíveis, entretanto, um bom equipamento de TC é capaz de demonstrar a maioria dos casos de NC com excessão de pequenas lesões. Apesar da RM prover melhores resoluções de imagens é muito mais cara e menos disponível, entretanto é menos sensível que TC para detecção de lesões calcificadas (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003).

A lesão cística hipodensa, de contornos bem delimitados e com escólex no seu interior corresponde ao cisticerco vivo ou forma ativa (SOTELO; GUERRERO; RUBIO, 1985). Com o processo de degeneração verifica-se a presença de lesão hipodensa com reforço em anel ou de lesão isodensa com reforço homogêneo na fase contrastada (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Apesar de imagens sugestivas de granulomas compatíveis com cisticercose reações imunológicas em alguns casos permanece negativa, assim é necessário realizar testes para diagnóstico diferencial com neuroinfecções como tuberculose, toxoplasmose e criptococose, neoplasias, abscessos, etc.

1.4.2 - Imunodiagnóstico

O imunodiagnóstico é um procedimento de baixo custo se comparado aos exames de neuroimagem e tem papel importante no diagnóstico, esclarecendo casos nos quais imagens são incertas. O desenvolvimento de novas técnicas contribuiu para o conhecimento da

importância do parasito uma vez que estas possibilitaram a realização de estudos soroepidemiológicos (DORNY et al., 2003).

A infecção com *T. solium* resulta na produção de anticorpos específicos, principalmente da classe IgG, assim o imunodiagnóstico da NC constitui na detecção de anticorpos contra antígenos da forma metacestódea de *T. solium* em amostras de soro, LCR, saliva ou sangue em papel de filtro, alcançando quase sempre papel central no diagnóstico (COSTA, 1986). Dentre as técnicas utilizadas estão fixação de complemento, hemoaglutinação, radioimunoensaio, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), imunoaglutinação em látex, técnicas de immunoblotting e teste imunocromatográfico magnético (GARCIA; SOTELO, 1991; FERREIRA et al., 1997; MILLER et al., 1984; COSTA et al., 1982; ROCHA et al., 2002; TSANG; BRAND; BOYER, 1989, HANDALI et al., 2010).

Inicialmente os antígenos utilizados nos testes de detecção de anticorpos foram líquido vesicular, produtos de excreção e secreção, antígenos de homogenatos totais de cisticerco de *T. solium* ou outras espécies relacionadas como *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps* (ARRUDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, antígenos totais apresentam sensibilidade moderada e pouca especificidade (DORNY et al., 2003). Dificuldades no imunodiagnóstico são relacionadas também à reatividade cruzada entre antígenos do cisticerco e anticorpos presentes no soro de pacientes com teníase por *T. solium*, *T. saginata* ou pacientes com outras doenças parasitárias como hidatidose (ISHIDA et al., 2003).

Para melhorar os resultados dos testes sorológicos, técnicas de purificação e pesquisas sobre propriedades antigênicas têm levado ao desenvolvimento de ferramentas diagnósticas melhores (ITO; CRAIG, 2003; MACHADO et al., 2007; NUNES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Uma busca no banco de dados do Pubmed sobre proteínas de *T. solium* resultou em 441 proteínas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), e destas várias têm sido utilizadas no diagnóstico da cisticercose (DECKERS; DORNY, 2010).

Vários pesquisadores têm testado novas técnicas para diagnosticar a NC: Prasad et al. (2008) desenvolveram um teste de transformação de linfócitos que apresentou sensibilidade de 93,3% e especificidade de 96,2%; Handali et al. (2009) relataram um teste que utiliza vários antígenos, o *multi antigen printing immunoassay* (MAPIA) que foi recentemente desenvolvido utilizando várias proteínas recombinantes de *T. solium* e apresentou bons parâmetros de sensibilidade e especificidade; Castillo et al. (2009) realizaram uma técnica para detecção de antígenos na urina através de anticorpo monoclonal com bons índices de

sensibilidade para pacientes com cisticercos viáveis; Verma et al. (2010) avaliaram uma técnica utilizando MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) para avaliação de viabilidade celular para diagnóstico da NC com sensibilidade e especificidade de 87,9% e 94,7%, respectivamente; Atluri et al. (2011) avaliaram antígenos 10-30kDa pela técnica de *Electro-immuno transfer blotting* (EITB) após eletroforese em gel bidimensional (2D) para diagnóstico em amostras de soro. Um antígeno recombinante (Tsol p27) foi avaliado pelo teste imuno dot blot alcançando sensibilidade de 86,7% e especificidade de 97,8% (SALAZAR-ANTON; TELLEZ; LINDH, 2012).

Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu a utilização de antígenos recombinantes no imunodiagnóstico da neurocisticercose, Ribeiro et al. (2010) isolaram peptídeos com grande potencial diagnóstico para neurocisticercose a partir de bibliotecas randômicas de peptídeos expostos em fagos um deles apresentando 100% de sensibilidade e outro com 100% de especificidade, o mais importante foi a ausência de reatividade cruzada da maioria dos clones selecionados com amostras de pacientes infectados com *Echinococcus granulosus*. Outro estudo com bibliotecas de peptídeos expostos em fagos selecionou clones capazes de diferenciar pacientes com as formas ativa e inativa da doença (MANHANI et al., 2011).

1.5 – *Phage Display*

Desde a sua descrição por Smith em 1985, a tecnologia de *phage display*, exposição de biomoléculas em fagos, têm apresentado utilização cada vez mais crescente em diversas áreas das ciências. O bacteriófago M13 é frequentemente utilizado para construção de bibliotecas utilizadas para esta técnica e é composto por cinco proteínas estruturais, presentes no capsídeo pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX. Milhares de subunidades de pVIII são mantidas unidas através de interações hidrofóbicas. As proteínas pIII e pVI são adicionadas ao virion no final da montagem. Elas formam uma cápsula distal no filamento e ao mesmo tempo liberam o virion da célula (RAKONJAC; MODEL, 1998; RAKONJAC; FENG; MODEL, 1999). Estas duas proteínas são requeridas para a estabilidade estrutural e também para o término da montagem do capsídeo.

A pIII faz a mediação da entrada do fago na célula hospedeira, ela é composta por três domínios (N1, N2 e C), separados por um ligante rico em glicina (BOEKE; MODEL, 1982). Seus dois domínios N-terminais (N1 e N2) se ligam aos receptores primário e secundário na célula alvo e seu domínio C-terminal está envolvido com o desencapsulamento viral e

entrada do DNA no citoplasma da célula hospedeira (BENNETT; RAKONJAC, 2006). As proteínas pII, pV e pX, estão envolvidas na replicação e permanecem no citoplasma enquanto todas as demais proteínas têm como alvo a membrana (ENDEMANN; MODEL, 1995).

Uma biblioteca biológica consiste de um *pool* de microorganismos expressando diferentes polipeptídeos. Cada microorganismo carrega apenas uma sequência de DNA ou RNA codificante para certo peptídeo, representando um clone. Cada clone na biblioteca pode ser propagado expressando o mesmo peptídeo (MERSICH; JUNGBAUER, 2008).

A proteína do fago mais utilizada para apresentar peptídeos é a pIII, que apresenta 3-5 cópias por vírion e é sintetizada com um sinal no peptídeo N-terminal que é clivado durante sua translocação na membrana interna. A porção N-terminal permite a inserção de fragmentos peptídicos com no máximo 30 aminoácidos (PHIZICKY; FIELDS, 1995; MERSICH; JUNGBAUER, 2008, RAKONJAC et al., 2011). A Figura 1 representa o bacteriófago M13.

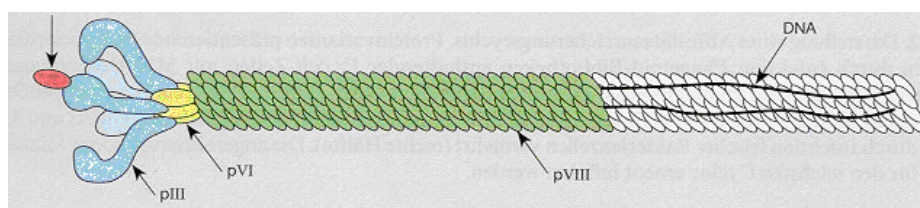


Figura 1 – Estrutura do bacteriófago M13. Fonte Universidad Complutense de Madrid (<http://www.ucm.es/info/genetica/grupod/Cromovibac/cromovibac.htm>)

Para construção de bibliotecas de peptídeos expostas em fagos as sequências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos de modo que a proteína codificada seja expressa na superfície do fago como um produto de fusão a uma das proteínas de sua superfície (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

O *phage display* permite a seleção de peptídeos e ou proteínas, incluindo anticorpos e peptídeos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A grande vantagem dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

O método básico para seleção de ligantes específicos é denominado *biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988), na qual o alvo de interesse é imobilizado em um suporte sólido e a biblioteca de *phage display* em solução é exposto ao alvo para permitir a ligação de

clones específicos. Vários ciclos de lavagem são realizados para eliminar os não ligantes e os que permanecem ligados são eluídos por alteração de pH. Em geral três ciclo de seleção são necessários para obtenção de clones específicos, para isto o *pool* de fagos específicos é amplificado em ciclos posteriores de seleção que resultam no enriquecimento do conjunto de fagos específicos contra o alvo e eliminação dos ligantes não específicos (SMITH, 1985, BARBAS et al., 2001).

O sucesso da seleção por *phage display* depende da complexidade da biblioteca: a maior diversidade de clones na biblioteca aumenta a probabilidade de conter seqüências que ligarão à um determinado alvo com maior afinidade (NOREN; NOREN, 2001).

Os peptídeos expressos, em forma linear ou conformacional, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítopos contínuos ou descontínuos (AZZAY; HIGHSMITH, 2002; DYBWAB et al., 2003).

Esta metodologia tem se mostrado útil não apenas para o mapeamento de interações proteína-proteína como na identificação de moléculas alvo importantes para o desenvolvimento de vacinas e drogas contra parasitos como *Plasmodium* sp., causador de malária e *Brugia malayi*, causadora de filariose linfática (GNANASEKAR et al., 2008; LANZILLOTTI; COETZER, 2008), levando ao desenvolvimento de veículos de entrega de vacinas (BENHAR, 2001), além do estudo para desenvolvimento de ferramentas diagnósticas aplicadas às mais diversas doenças incluindo a NC (RIBEIRO et al., 2010; MANHANI et al., 2011).

1.6 – Utilização de fragmentos de anticorpos expostos em fagos - scFv

Anticorpos são algumas das ferramentas mais poderosas na terapia e no diagnóstico e são uma das classes de moléculas terapêuticas que mais vem crescendo. Fragmentos de anticorpos recombinantes tem se tornado alternativas aos anticorpos monoclonais de comprimento total uma vez que são menores e possuem diferentes propriedades que são vantajosas além de serem produzidos de maneira mais barata. Fragmentos de cadeia única das regiões variáveis de anticorpo (*Single Chain Variable Fragment* - scFv) são um dos formatos de anticorpos recombinantes mais populares uma vez que podem ser criados maiores, multivalentes, bivalentes e em formas conjugadas com várias aplicações (WEISSER; HALL, 2009, AHMAD et al., 2012).

A primeira molécula de scFv foi desenvolvida por Bird et al. (1988) e Huston et al. (1988) e representa o menor domínio VH-VL funcional de um anticorpo necessário para uma ligação de alta afinidade ao antígeno (WEISSER; HALL, 2009).

Os peptídeos conectores flexíveis que ligam as cadeias pesadas (VH) e leve (VL) são usualmente compostos por 10 a 25 aminoácidos, sendo o decapentapeptídeo (Gly4Ser)3 o mais comum deles (WEISSER; HALL, 2009). As regiões variáveis podem ser conectadas no sentido VH-conector-VL ou VL-conector-VH e a orientação das cadeias no scFv pode afetar a eficiência da expressão, estabilidade e capacidade de ligação do mesmo ao antígeno (DESPLANCQ et al., 1994).

A descoberta de que scFvs poderiam ser expostos na superfície de bacteriófagos permitiu a seleção de anticorpos contra antígenos sem a necessidade da utilização de hibridomas (MCCAFFERTY et al., 1990). Bibliotecas de anticorpos scFvs expostos em fagos consistem de uma variedade de domínios pesados e leves que são fundidos à proteína pIII do capsídeo do fago e expostas externamente como scFv (Figura 2) (VAUGHAN et al., 1996). A Figura 3 mostra a comparação entre um anticorpo IgG, Fab e scFv.

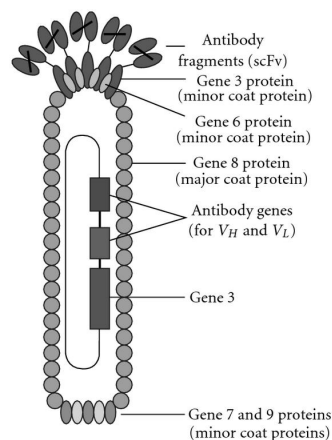


Figura 2 - Esquema da estrutura do bacteriófago M13 carregando o fragmento de anticopos scFV (Ahmad et al., 2012).

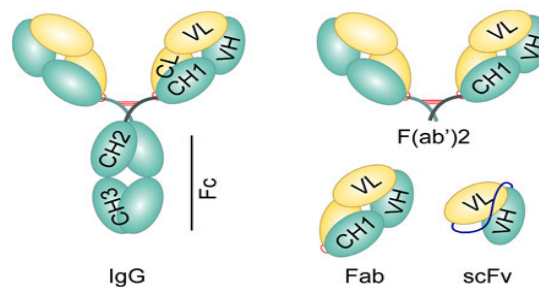


Figura 3 - Esquema da estrutura do anticorpo IgG completo demonstrando a porção F(ab')₂, Fab e a menor porção funcional de um anticorpo, scFv (www.aapsj.org).

Atualmente são escassos os anticorpos mono e policlonais específicos para agentes infecciosos disponíveis, o que torna limitante a realização de pesquisas e também a aplicação de diversos métodos de imunodiagnóstico. Com isso, a evolução das técnicas de produção de fragmentos de anticorpos funcionais possibilita a obtenção de anticorpos com alta sensibilidade e especificidade, fazendo com que a amplificação de seu uso se torne uma realidade que possa ser empregada no diagnóstico da NC.

A aplicação de bibliotecas de anticorpos em fagos para a identificação de antígenos específicos traz informações importantes sobre mecanismos moleculares. Como *T. solium* ainda não está totalmente caracterizada a nível molecular, esta técnica pode definir anticorpos que podem ser utilizados para desenvolver um teste imunodiagnóstico simples e sensível, além de prover informações sobre os mecanismos moleculares da doença e promover o descobrimento de alvos vacinais.

2 – OBJETIVOS

- Selecionar clones de anticorpos scFv ligantes à peptídeos expressos em fagos específicos para o diagnóstico da neurocisticercose com a finalidade de caracterizar os antígenos verdadeiros;
- Utilizar os clones de anticorpos selecionados para captura de novos antígenos com potencial aplicação no sorodiagnóstico da neurocisticercose humana.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU) sob o número de referência 041/09.

3.2 - Obtenção das formas metacestódeas de *T. solium*

Os metacestódeos de *T. solium*, anteriormente disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses – UFU foram obtidos de músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados, lavados em solução salina (NaCl, 0,15 M) por quatro vezes, identificados e armazenados a – 20 °C.

3.3 - Preparo do extrato salino (S) total de metacestódeos de *T. solium*

Foram utilizados 50 metacestódeos íntegros ou rompidos de *T. solium* para o preparo do extrato salino total (S), de acordo com Costa (1986), com algumas modificações. Os metacestódeos foram triturados em graal e ressuspensos em 2,5 mL de água destilada e em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos (Glas Col[®], USA) por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica, São Paulo, Brasil) a 40 kilohertz (kHz) por quatro ciclos de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonzificação com 2,5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi submetida a 4 °C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12.400 x g (Du Pont Sorvall[®] Products Newton, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato S.

3.4 - Preparação do fago auxiliar VCSM13

Todo procedimento para preparação do fago auxiliar foi realizado de acordo com protocolo descrito por Barbas et al. (2001).

3.4.1- Obtenção de placas de lise

Para a obtenção das placas de lise, foram inoculados 10 µL de células XL1-Blue eletrocompetente em 10 mL de meio *Superbroth* (SB) contendo tetraciclina 10 µg/mL, incubado a 37 °C, sob agitação até atingir densidade ótica (DO) a 600 nm igual a 1,0. Em seguida, foram feitas alíquotas de 50 µL de células em microtubos, adicionado 1 µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}), para garantir a formação de placas de lise isoladas, e incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente. Os 50 µL da cultura foram adicionados em 3 mL de meio Luria-Bertani (LB) top ágar liquefeito (45-50 °C) e vertido em uma placa de Petri contendo LB ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas, após este período observou-se a formação de placas de lise.

3.4.2 - Amplificação do fago helper VCSM13

Para a amplificação das placas de lise, foram inoculados 50 µL de células XL1-Blue eletrocompetente em 50 mL de meio SB pré-aquecido a 37 °C, com tetraciclina 10 µg/mL, em um tubo Falcon de 50 mL e incubado a 37 °C durante uma hora sob agitação. Uma placa de lise foi transferida com auxílio de um palito estéril ao tubo contendo a cultura de bactérias, para que ocorresse a infecção, em seguida, o tubo foi incubado a 37 °C sob agitação durante 2 horas. A cultura infectada foi transferida para um Erlenmeyer de 1 litro com 250 mL de meio SB pré-aquecido a 37 °C, suplementado com tetraciclina 10 µg/mL, e incubada a 37 °C sob agitação durante 1 hora. Após este período, foi adicionada kanamicina 70 µg/mL e houve incubação 37 °C, sob agitação por 16 horas. Em seguida, a cultura foi transferida para tubos estéreis, centrifugada a 2500 x g durante 15 minutos e o sobrenadante coletado em tubos novos. O sobrenadante foi submetido à incubação a 70 °C durante 20 minutos para eliminar as células residuais e, então, foi centrifugado a 2500 x g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi estocado em tubos estéreis a 4 °C.

3.4.3 - Determinação do título da preparação de fagos auxiliares

Para determinar o título da preparação dos fagos auxiliares, os mesmos foram inoculados em 2 mL de meio SB, contendo tetraciclina (10 µg/mL) e 2 µL de células XL1-blue eletrocompetentes, as quais foram previamente incubadas a 37 °C em agitação até

atingir uma DO a 600 nm entre 0,6 a 1,0. As células foram distribuídas em alíquotas de 50 µL em microtubos e adicionado 1µL de fagos auxiliares diluídos (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos. Foram adicionados os 50 µL de células infectadas a 3 mL de meio LB top ágar, misturado e espalhado em placas contendo meio LB ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas e após este período as placas de lise foram contadas e o título de fagos foi determinado em unidades formadoras de placas (pfu) por mL de fagos.

3.5 – Biblioteca de fragmentos de anticorpos expostos em fagos - scFv

Ao final de todo o processo de construção, foi obtida uma biblioteca da ordem de $4,6 \times 10^6$ sequências de fragmentos de anticorpos scFv, gentilmente cedida por Thaise Gonçalves de Araújo (Laboratório de Nanobiotecnologia / UFU).

Por ser uma biblioteca com alta variabilidade, muito acima da quantidade anticorpos nativos esperados, e devido à experiência prévia de seleção para outros alvos biológicos não-tumorais e em doenças infecciosas, propusemos utilizar esta biblioteca com a finalidade de obter anticorpos scFv humanos que tivessem especificidade ao alvo deste trabalho com boas chances de sucesso.

3.6 - Reamplificação da biblioteca scFv

Foram inoculados 50 µL de células XL1-Blue eletrocompetentes em 50 mL de meio SB contendo tetraciclina (10 µg/mL). A cultura foi agitada a 37 °C até atingir DO a 600 nm de 1,0. À cultura foram adicionados 50 µL da biblioteca seguida da incubação a 37 °C durante 2 horas. Em seguida foram adicionados carbenicilina (50 µg/mL) e glicose para uma concentração final de 2%. Nesta etapa, foi possível titular a saída dos fagos infectantes inoculando-se 1 µL das diluições de 10^{-4} , 10^{-5} , e 10^{-6} da cultura infectada em placas contendo LB ágar suplementado com carbenicilina e 2 % de glicose. Os 50 mL de cultura infectada foram incubados a 37 °C durante 1 hora. Após esse período foram adicionados mais 15 µL de carbenicilina (100 µg/mL) seguida de nova incubação a 37 °C por 1 hora. A cultura foi sedimentada por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos e ressuspensa em 50 mL de SB contendo os antibióticos nas proporções anteriores. Em seguida foram adicionados 2 mL do fago auxiliar VCSM13 e 150 mL de meio SB contendo carbenilicilina (50 µg/mL) e

tetraciclina (10 µg/mL). A cultura total foi incubada a 37 °C por 2 horas com posterior adição de 280 µL de kanamicina (50 µg/mL) e incubação nas mesmas condições por 16 horas.

Em seguida, a cultura foi submetida à centrifugação a 3000 x g durante 15 minutos a 4 °C. O sedimento foi estocado a -20 °C para futuras preparações plasmidiais. Ao sobrenadante foram adicionados 8g de PEG 8000 (polietilenoglicol) e 6g de cloreto de sódio e agitado a 250 rpm, durante 10 minutos a 37 °C. Em seguida, o sobrenadante foi incubado em banho de gelo durante 30 minutos. Os fagos foram coletados por centrifugação a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a garrafa mantida invertida sobre papel toalha, por pelo menos 10 minutos. Para garantir a secagem do sedimento, as bordas da garrafa foram enxugadas com papel toalha. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de TBS-BSA 1% (*Tris buffered saline* contendo soroalbumina bovina 1%) (p/v), a suspensão foi transferida para dois microtubos e centrifugada a 12.000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante contendo as partículas virais foi transferido para um tubo novo e estocado a 4 °C.

3.7 - Acoplamento de fagos a *beads* epoxy

Coletou-se as microesferas (Dynabeads M270 Epoxy - Invitrogen) que foram colocadas em aparato magnético DynaMag-2 (Invitrogen) para retirada do sobrenadante, em seguida estas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se na proporção de 3:1 sulfato de amônio 3 M e tampão fosfato 1,2M. Os fagos foram acrescentados na concentração de 1×10^{12} para os fagos NC₂₂ e NC₄₁ e 5×10^{12} para o fago M13 selvagem e incubado por 16-24h a 37 °C sob agitação. Em seguida as microesferas foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com PBS-BSA 5% (Salina tamponada com fosfato acrescida de soroalbumina bovina) para bloqueio a 37 °C por 1 hora. As microesferas foram lavadas uma vez com PBS e ressuspensionadas em PBS.

3.8 - Seleção de anticorpos recombinantes scFv

Para a seleção de anticorpos scFv foram utilizados dois diferentes alvos: extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* e peptídeos expostos em fagos NC₂₂ e NC₄₁ obtidos anteriormente (Ribeiro, 2009).

Foram conduzidos dois ciclos de seleção, sendo cada um deles antecedido pela reamplificação da biblioteca de scFv em *Escherichia coli* da linhagem XL1-Blue eletrocompetentes com o auxílio do fago VCSM13, para a montagem e replicação das proteínas virais (BARBAS et al., 2001).

Para o extrato S foi realizada a seleção em uma placa de microtitulação: dois poços de uma placa de microtitulação (NUNC MaxiSorp®), foram previamente adsorvidos com 10µg do ES, diluído em 50 µl de tampão de sensibilização (em 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6) e incubados por 18 horas a 4 °C. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com 250 µl de solução bloqueio TBS- BSA 3% (p/v) por 1 hora a 37 °C; e lavada seis vezes com TBS-T 0,05% (Salina tamponada com tris acrescida de tween 20 0,05%) (v/v) no segundo ciclo a estringência foi aumentada pela utilização de TBS-T 0,1%. Foram adicionados 70 µL da biblioteca recém amplificada em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Os fagos contendo scFv ligantes foram eluídos com solução ácida (Glicina-HCl, pH 2,2) e posteriormente neutralizados com 2 M de Tris, pH 9,1, e transferidos para a cultura de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes que se encontravam na DO a 600 nm= 1.0 para a infecção, amplificação e titulação dos bacteriófagos.

Para os fagos NC₂2 e NC₄1 foi realizada a seleção em microesferas epoxy: Para a seleção negativa utilizou-se uma alíquota de 20 µL de microesferas contendo fagos selvagens acoplados, o sobrenadante foi coletado, os *beads* lavados 6 vezes com TBS-T 0,05% (no segundo ciclo a estringência foi aumentada pela utilização de TBS-T 0,1% e adicionou-se 50 µL da biblioteca e incubou-se por 1 h a 37 °C. A seguir o sobrenadante foi coletado e transferido para o microtubo contendo 20 µL de microesferas contendo fagos NC₂2 ou NC₄1 acoplados, incubou-se 1 h a 37 °C, descartou-se o sobrenadante e os fagos ligantes foram eluídos com solução ácida (Glicina-HCl, pH 2,2) por 10 minutos e posteriormente neutralizados com 2 M de Tris, pH 9,1, e transferidos para a cultura de bactérias XL1-Blue eletrocompetentes que se encontravam na DO a 600nm= 1.0 para a infecção, amplificação e titulação dos bacteriófagos.

3.9 - Extração do DNA plasmidial

Após o término do segundo ciclo de seleção bactérias foram submetidas à extração do DNA plasmidial utilizando-se o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Após a eluição os fagos foram acrescidos a uma cultura de *E. coli* XL1 Blue na DO a 600 nm = 1,0, incubados por 1 h a 37 °C. Em seguida foram adicionados carbenicilina (50 µg/mL) e glicose para uma concentração final de 2% e incubou-se a cultura por 1h. A seguir 5 ml da cultura foram centrifugados a 3000 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 250 µL de tampão P1. Acrescentou-se 250 µL de tampão P2 e o tubo foi invertido até que a solução ficasse azul, 350 µL de tampão N3 foram adicionados e o tubo invertido até que a solução ficasse branca.

Centrifugou-se a 13.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi aplicado na coluna e centrifugado por 60s, para que o líquido passasse pela membrana. A coluna foi lavada com 500 µL de tampão PB e centrifugada por 60 s. O líquido que atravessou a membrana foi descartado e a coluna lavada com 750 µL de tampão PE e centrifugada por 60 s. Em seguida, após o líquido passar pela membrana este foi retirado da coluna e transferido para um novo tubo de 1,5 mL, adicionou-se 50 µL de tampão EB, a coluna permaneceu em repouso por 1 minuto e centrifugada por 2 minutos. O filtrado resultante constituiu uma solução contendo o DNA plasmidial, que foi analisado em gel de agarose 0,8 %.

3.10 - Transformação da linhagem de *E. coli* não supressora Top 10 com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção

Aliquotas de 200 µL de bactérias Top10 eletrocompetentes foram eletroporadas com 2 µL do DNA plasmidial e em seguida incubadas com 3 mL de meio SOC por 1 hora a 37 °C sob agitação. Aliquotas de 10 e 100 µL da cultura foram plaqueadas em LB Agar contendo carbenicilina.

3.11 - Produção de scFv na forma solúvel em placa *deep well*

Após a eletroporação colônias contendo clones individuais, eluídos após o segundo ciclo de seleção foram inoculados em 1mL de meio SB contendo 100 mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2 M (v/v), em placa *deep well* e crescidos por 16 horas agitação a 37 °C. A seguir, 50 µl da cultura de cada clone foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, estéril, contendo 1 mL de meio SB suplementado com 100 mg/mL de carbenicilina e 2% de glicose 2 M (v/v) e incubada a 37 °C até atingir uma DO a 600nm próxima de 1. Após esse período a cultura foi centrifugada a 3.700 rpm durante 10 minutos e o sedimento ressuspense em 1,5mL de SB suplementado com carbenicilina (100 µg/mL) e

IPTG (Isopropil β -D-thiogalactopiranosídeo) a 2 mM. A placa foi incubada sob agitação a 30 °C por 18 horas seguida de centrifugação a 3.700 rpm por 20 minutos. O sobrenadante de cultura foi transferido para uma nova placa e armazenado a 4 °C até ser utilizado nos ensaios ELISA.

3.12 - Teste ELISA para análise da expressão heteróloga de moléculas scFv

Este ensaio foi realizado para detectar clones que expressavam scFv no sobrenadante de cultura induzida por IPTG. Placas de microtitulação foram sensibilizadas durante a noite a 4 °C com o sobrenadante da cultura induzida, em tampão carbonato. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 300 μ L de PBS-BSA 3% durante 1 hora à 37 °C. Na sequência, o bloqueio foi descartado e a placa lavada uma vez com PBS e foram adicionados 50 μ L anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche, Basel, Suíça) na diluição de 1:1000 em PBS-BSA 3% e a placa foi mantida por 1 hora e trinta minutos a 37 °C, sob leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST. Para revelar a reação, foram utilizados 50 μ L do substrato OPD (ortofenilenodiamina-Sigma, St. Louis, Missouri, EUA) e peróxido de hidrogênio (10 mg de $C_6H_4(NH_2)_2$ + 10 μ L H_2O_2 30% + 25 mL de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0) incubados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com 30 μ L de H_2SO_4 2N. A leitura da reação foi realizada em leitora de ELISA Multiscan Plus Versão 2.03 no comprimento de onda 492 nm, considerando-se os brancos contendo sobrenadante de cultura de bactérias transformadas com pComb3XSS vazio.

3.13 – Dot-blot para análise da expressão heteróloga de moléculas scFvs

Este ensaio foi realizado para confirmar a reatividade dos clones que secretavam scFv detectados no teste ELISA com sobrenadante de cultura induzida por IPTG.

Foram pipetados 5 μ L do sobrenadante da cultura de cada clone individual, em membrana de nitrocelulose 0,22 μ m (Hybond ECL, Amersham Biosciences, Waukesha, Wisconsin, EUA), após secagem à temperatura ambiente (TA), a membrana foi bloqueada com uma solução de PBS-BSA 3% e incubada a TA sob agitação por 1 hora. A membrana foi lavada, rapidamente, por 3 vezes com PBST 0,05%, imersa em uma solução contendo o anticorpo anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) (diluído 1:1000 em PBS BSA 3%) e

incubada durante 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada por 3 vezes, rapidamente, com PBST 0,05% e o ensaio foi revelado com o substrato DAB (3,3 de diaminobenzidina - Sigma). Para interromper a reação, a membrana foi lavada em água destilada.

3.14 - Análise dos fragmentos de anticorpos selecionados por ELISA – *Pre-screening*

O objetivo da realização deste *pre-screening* foi selecionar os clones mais reativos obtidos no *biopanning* dentre aqueles positivos no teste de expressão.

Placas de microtitulação (*Nunc Maxisorp*) foram sensibilizadas com os fagos NC₂2, NC₄1 (10^{10} PFU) e S (1µg/well). Após incubação durante a noite à 4 °C a solução foi descartada. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com 300 µL de PBS-BSA 3% durante 1 hora à 37 °C. Na sequência, o bloqueio foi descartado e a placa lavada uma vez com PBST 0,05% e adicionou-se 100 µL do sobrenadante de cultura de indução dos scFvs. Seguiu-se incubação por 1 hora à 37 °C, sob leve agitação. Após a incubação os sobrenadantes foram descartados e a placa lavada 3 vezes com PBST 0,05%. O anticorpo secundário anti-HA conjugado com peroxidase (Roche) foi posteriormente adicionado na diluição de 1:1000 em PBS-BSA 3% e a placa foi mantida por uma hora e trinta minutos a 37 °C, sob leve agitação. O anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes com PBST. Para revelar a reação, foram utilizados 50 µL do substrato OPD e peróxido de hidrogênio com incubação à TA, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com 30 µL de H₂SO₄ 2N. A leitura da reação foi realizada no comprimento de onda 492 nm, considerando-se os poços da placa que foram sensibilizados com PBS-BSA 3% (brancos).

A especificidade dos scFvs selecionados contra peptídeos expostos em fagos foi testada por ensaios de ELISA. As placas de microtitulação (*Nunc Maxisorp*) foram sensibilizadas com 10^{10} PFU/well dos fagos NC₂2, NC₄1 e selvagem (controle negativo) procedendo o teste como descrito anteriormente, sendo a diluição do anticorpo anti HA 1:250.

3.15 - Produção de scFv em maior escala

Os clones selecionados pelos testes de ELISA e *dot blot*, foram utilizados para avaliações em testes mais específicos. Para realizar os ensaios seguintes, os clones foram induzidos novamente (como descrito no item 3.11), porém num volume maior de cultura (200 mL).

3.16 - Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC

Colunas níquel sepharose HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, Wisconsin, EUA) foram utilizadas uma vez que os anticorpos expressos possuem uma cauda de histidina. O protocolo de purificação realizado seguiu as recomendações do fabricante.

As frações que apresentaram maiores concentrações foram reunidas em um tubo, concentradas utilizando tubo Amicon 3kDa (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA) e dosadas de acordo com a técnica descrita por Bradford (1976).

3.17 - Análise em gel SDS-PAGE e *western blotting* (WB)

Para verificar a integridade dos clones de anticorpos amostras purificadas de scFv foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16%. Os géis foram desmontados e submetidos à coloração com prata de acordo com a metodologia descrita por Friedman et al. (1982) ou transferidos para membrana de nitrocelulose 0,22 µm.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau durante 5 minutos e, em seguida, lavada com água ultrapura até a visualização das bandas. Posteriormente, a membrana foi cortada e os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS-BSA 3% por 1 hora, à TA sob leve agitação. Cada tira de membrana foi lavada por 3 vezes com PBST 0,05%. As tiras foram incubadas com anticorpo anti-HA marcado com peroxidase 1:1000 em PBS-BSA 3%. Para controle negativo o S foi utilizado. As membranas foram lavadas por mais 3 vezes, nas mesmas condições descritas acima, e a reação revelada pela adição do substrato DAB.

3.18 – Dot blot

Tiras foram cortadas de uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham Biosciences) (1 tira para cada clone testado). Foram pipetados 5 µl do fago correspondente (NC₂2 ou NC₄1) além do fago selvagem (controle negativo) para verificar a especificidade, e em outra tira colocou-se o S e PBS para testar clones selecionados contra ele.

As membranas foram bloqueadas com PBS-BSA 3% por 1 hora à temperatura TA. Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens com PBST 0,05%. Os clones selecionados foram incubados por 1 hora à TA (1:100 em PBS-BSA 3%), sob leve agitação. Em seguida, precedeu-se as lavagens (3X) e o anticorpo secundário anti-HA conjugado com peroxidase 1:1000 em PBS-BSA 3% foi adicionado. As membranas permaneceram sob incubação a TA por 2 horas sob leve agitação. Mais 3 lavagens foram realizadas e a revelação ocorreu com o substrato DAB. Ao surgimento da marcação a membrana foi lavada em água destilada.

3.19 - Imunofluorescência

As formas metacestódeas foram incluídas em Tissue-tek (Tissue Freezing Medium, Durham, NC, USA) e congelados a -70 °C. Secções de 2 µm de espessura foram obtidas e os cortes foram colocados em lâminas para microscopia, que foram deixadas a TA por 30 min para secagem. Os clones de scFv purificados (10 µg) foram diluídos em PBS e incubados por 40 min a 37°C com o corte. Após duas lavagens de 5 min cada em PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti HA marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC- 6 µg/ml) diluído em azul de Evans por 40 min a 37 °C. Após duas lavagens com PBS as lâminas foram montadas utilizando glicerina tamponada e lamínula. A ligação dos clones de anticorpos foi verificada em microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.20 - Seqüenciamento das cadeias variáveis pesadas e leves dos clones

As reações de seqüenciamento foram preparadas com o kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing (GE Healthcare life sciences) e utilizando-se seqüenciador automático capilar MegaBace. As amostras foram preparadas para seqüenciamento em placas de 96 poços contendo aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial e 2,5 pmoles do

oligonucleotídeo MMB4 (senso) ou 2,5 pmoles do oligonucleotídeo MMB5 (reverso), em um volume final de 10 μ L.

As seqüências foram analisadas pelo Igbblast no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>).

3.21 – Captura de antígenos a partir do extrato salino total

Com a finalidade de caracterizar os antígenos verdadeiros cada clone de anticorpo foi acoplado em uma resina de níquel.

Para a captura foi utilizado 80 μ l da resina (Ni Sepharose 6 Fast Flow - GE Healthcare Life Sciences), após uma lavagem com três volumes de água e duas lavagens com tampão de ligação/lavagem (20 mM Na_2HPO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7.0) os clones de anticorpos foram adicionados (A4, B6 e G10) na concentração de 135 μ g e incubados sob agitação a TA por 1 hora. Em seguida foram feitas duas lavagens com tampão de ligação/lavagem e acrescentou-se o S na concentração de 540 μ g. Após uma hora de incubação à TA sob agitação e duas lavagens foi realizada a eluição. Para eluir os antígenos capturados pelos clones de anticorpos, foi utilizado tampão contendo imidazol (20 mM fosfato de sódio, 0.5 M NaCl, 500 mM imidazol, pH 7,4) por 5 minutos.

As frações eluídas foram dosadas de acordo com o método de Bradford (1976), analisadas por SDS-PAGE 16%, aliqüotadas e mantidas a -20°C para posterior utilização.

3.22 - Sequenciamento das proteínas capturadas

As proteínas foram precipitadas em solução utilizando o ProteoExtract kit (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) e o pellet foi deixado para secar durante a noite em uma capela de exaustão. O *pellet* liofilizado foi ressuspense em 50 mM de bicarbonato de amônio (pH 8.0) e sujeito a uma digestão triptica em solução (Mike Myers, Cold Spring Harbor modified by Brett S. Phinney, UC Davis Proteomics Core). Os peptídeos digeridos foram então dessalinizados por meio de ponteiras de aspiração (Aspire tips, RP30 tips, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) antes de serem ressuspensidos em tampão de corrida.

3.22.1 - Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas - LC-MS/MS

Os peptídeos digeridos foram analisados utilizando um espectrômetro LTQ-FT (Thermo Fisher Scientific) acoplado com um aparelho de cromatografia líquida alta performance (HPLC) MG4 paradigm (Michrom, Auburn, CA). As amostras foram aplicadas em um Michrom cap trap (0.5x2mm) para remoção de impurezas como sais e detergentes, separadas utilizando uma coluna de fase reversa Michrom Magic C18AQ (200 µm×150 mm) e eluídos utilizando gradiente de duração de 60 minutos. As amostras foram sujeitas a dissociação induzida por colisão e os dados coletados.

3.22.2 – Análise dos dados de espectrometria de massas

Os dados brutos foram analisados utilizando o software X!Tandem e visualizados pelo programa Scaffold (Proteome Software, version 3.01). Foi realizada uma busca no banco de dados Uniprot (www.uniprot.org) por amostras relacionados com *Taenia solium* (304 sequencias disponíveis).

3.23 – Fracionamento do antígeno total de metacestódeos de *T. solium* por cromatografia de troca iônica

Com o objetivo de selecionar novos antígenos para aplicação no imunodiagnóstico da NC, frações do extrato salino foram obtidas pelo fracionamento por troca iônica.

O extrato salino de *T. solium* foi fracionado em resina de troca iônica sepharose dietilaminoetil celulose – DEAE (GE Healthcare Life Sciences). A suspensão de resina foi distribuída em microtubo (1,5 ml) e centrifugada (2000 x g, 1 minuto), até atingir um volume final de resina de 200 µL. A mesma foi equilibrada com 600 µL de PBS e procedeu-se o fracionamento. Foram aplicados 200 µL de extrato S, o tubo foi deixado 20 minutos em agitação horizontal. O sobrenadante deste homogenato constituiu a 1ª fração – DEAE S1 – a qual não interagiu com a resina. Logo em seguida, a resina foi lavada 3 vezes com PBS pH 7,2 e eluída com tampão fosfato pH 8,0 acrescido de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M. O sistema foi agitado horizontalmente por 5 a 10 minutos e, logo após, centrifugado por 2 minutos a 2000 x g. O sobrenadante deste constituiu a 2ª fração – DEAE S2 - com componentes analíticos interativos com o grupo DEAE.

Depois de utilizada, a resina foi recuperada em ciclos de lavagem com tampão ácido e básico. Foi realizada a dosagem protéica das frações resultantes pelo método de Lowry et al., (1951). Posteriormente, estas frações foram analisadas por SDS-PAGE 16% e testadas por ELISA para detecção de IgG.

A análise do gel foi realizada utilizando o programa Image J versão 1.44 (National Institutes of Health, Bethesda, EUA), os picos foram comparados com um padrão de peso molecular (Real Biotech, RECOMTM Blue Wide Range Prestain Marker, Banqiao City, Taiwan) para estimar seu peso molecular relativo.

3.24 - ELISA para seleção da fração com melhores parâmetros diagnósticos

3.24.1 - Amostras de soro

As amostras de soro de pacientes com neurocisticercose foram obtidas por meio da alíquota que seria desprezada, após os exames de rotina, pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG (HC-UFU). As amostras de soro de pacientes com teníase e outras parasitoses foram colhidas a partir de resultados positivos de exames de fezes realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU. As amostras do grupo controle foram obtidas de indivíduos da comunidade que consentiram em participar do projeto. Todas as amostras estão disponíveis no banco de soro do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses – UFU. Foram obtidas 120 amostras de soro, divididas em três grupos:

3.24.1.1 – Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose (Grupo 1)

Foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (1996). Sob tais critérios, um diagnóstico definitivo de NC se baseia na presença de um critério absoluto que pode ser a demonstração histológica do parasito por biópsia, visualização do escólex da forma metacestódea por TC ou RM ou a visualização direta do parasito na subretina através do exame de fundo de olho; a presença de dois critérios principais, um critério secundário e um critério epidemiológico levam ao diagnóstico desta doença.

3.24.1.2 – Amostras de soro de pacientes infectados por outros parasitos, incluindo *Taenia* sp. (Grupo 2)

Com o objetivo de verificar a reatividade cruzada nos métodos imunológicos, foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes infectados por: *Ancilostomideos* (n=6), *Ascaris lumbricoides* (n=3), *Enterobius vermicularis* (n=3), *Hymenolepis nana* (n=4), *Schistosoma mansoni* (n=7), *Strongyloides stercoralis* (n=7), *Taenia* sp. (n=6) e *Trichuris trichiura* (n=4).

As amostras de soro foram colhidas de indivíduos com exames parasitológicos de fezes positivos após a análise de três amostras fecais pelos métodos de HPJ e/ou Baermann-Moraes (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934; BAERMANN, 1917; MORAES, 1948; LUTZ, 1919), sendo todas triadas pelo Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses-UFU.

3.24.1.3 – Amostras de soro controle de indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3)

Foram utilizadas 40 amostras de soro de indivíduos voluntários, assintomáticos, que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ e Baermann- Moraes (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934; BAERMANN, 1917; MORAES, 1948; LUTZ, 1919). Estes indivíduos apresentaram sorologia negativa para NC, utilizando o extrato S e negaram histórico anterior de teníase-cisticercose.

3.24.1.4 – ELISA com as frações resultantes do fracionamento por troca iônica

Testes ELISA foram realizados para triar a fração com melhores parâmetros diagnósticos para posterior utilização na captura de novos antígenos.

Testes preliminares foram realizados para determinar as condições ótimas para o ELISA, através da titulação em bloco dos reagentes (antígenos, soro e conjugado).

O experimento foi realizado de acordo com Gonzaga et al. (2011) com modificações. Microplacas de poliestireno foram utilizadas como suporte para adsorção do S e de suas frações (DEAE S1 e DEAE S2), a uma concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio a 0,06 M (pH 9,6). As placas, após sensibilizadas com 50 µL do preparado, foram mantidas em câmara úmida a 4° C durante a noite. Foram lavadas com PBST 0,05%; três lavagens de 5 minutos. As etapas subsequentes foram conduzidas

utilizando PBST como diluente do soro e conjugado e lavagens com PBST 0,05% foram feitas entre os passos da reação.

As amostras de soro foram diluídas em PBST 0,05%, posteriormente foram adicionadas, em duplicata, diluídas a 1:200 e incubadas em câmara úmida a 37 °C por 45 minutos. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas 3 vezes (5 minutos cada). Posteriormente foi adicionado às placas, para a detecção do IgG, conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase, na diluição 1:2000; a incubação foi realizada por 45 minutos a 37 °C.

A reação foi revelada utilizando OPD e peróxido de hidrogênio. A placa foi mantida por 10 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução 2 N de H₂SO₄. A leitura foi realizada em leitor ELISA Multiscan Plus Versão 2.03 com filtro de 492 nm.

3.25 – Captura de novos antígenos

A captura de novos antígenos com potencial aplicação no imunodiagnóstico da NC foi realizada como descrito no item 3.22, de acordo com o esquema da Figura 4, abaixo.

Os três clones A4, B6 e G10 foram utilizados para capturar antígenos tanto do extrato salino total quanto da fração DEAE S2 obtida pelo fracionamento em resina DEAE. Todas as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE 12%.

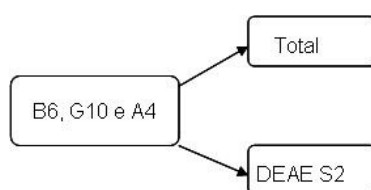


Figura 4 – Esquema da captura de antígenos, cada clone foi utilizado para capturar antígenos a partir do extrato salino total e da fração DEAE S2.

3.26 – ELISA com os antígenos capturados

Placas de microtitulação (*Polysorp*) foram sensibilizadas com os seis antígenos capturados (A4, B6 e G10 total e A4, B6 e G10 DEAE S2), com o extrato salino total e a fração DEAE S2 (10 µg/mL). Após incubação durante a noite a 4 °C a solução foi descartada, as placas foram lavadas 3 vezes de cinco minutos cada com PBST 0,05% e foram adicionados

50 µL do soro de pacientes com NC, outras parasitoses e saudáveis (30 amostras de cada grupo diluídos 1:200). Após incubação por 1 hora à 37 °C, a placa foi lavada 3 vezes com PBST 0,05%. O anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase foi posteriormente adicionado na diluição de 1:2000 em PBST 0,05% e a placa foi mantida por 1 hora a 37 °C. Em seguida a placa foi lavada novamente e a reação revelada utilizando-se OPD (5 mg), num volume final de 50 µL com tampão apropriado contendo 5 µL de H₂O₂ a 30%. A interrupção foi realizada pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 2 N, e a leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus Versão 2.03, com filtro de 492 nm.

3.27 – *Western Blotting* com os antígenos capturados

O eluato contendo os antígenos capturados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Os géis foram desmontados e submetidos à coloração com prata de acordo com a metodologia descrita por Friedman et al. (1982) ou transferidos para membrana de nitrocelulose 0,22 µm.

Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau durante 5 minutos e, em seguida, lavada com água ultrapura até a visualização das bandas. Posteriormente, a membrana foi cortada e os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBST M 5% (PBST acrescido de leite em pó desnatado 5%) por 1 hora, à TA sob leve agitação. Cada tira de membrana foi lavada por 6 vezes com PBST M 1%. As tiras foram incubadas com *pool* de amostras de soro (G1, G2 e G3) diluídas 1:50 em PBST M. Após incubação *overnight* a 4 °C e 6 lavagens como descrito anteriormente, o anticorpo secundário, anti IgG humana marcado com peroxidase (whole molecule - Sigma) diluído 1:1500 em PBST M 1% foi adicionado. Após incubação a TA por 2 horas e lavagens com PBS a reação foi revelada pela adição do substrato DAB e interrompida pela lavagem com água destilada.

3.28 – Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional com pacotes estatísticos GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Os melhores parâmetros de diagnóstico para o ELISA, inclusive, o ponto de corte (*cut-off*) foram estabelecidos pela *receiver operating characteristic* (ROC) e a *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC) (GREINER; SOHR; GOBEL, 1995). A TG-ROC é um gráfico que avalia concomitantemente sensibilidade (Se) e especificidade (Es) em relação a um intervalo

de possíveis *cut-off* (*intermediate range*; IR – Índice de reatividade), auxiliando na determinação de um *cut-off* ótimo. Os pontos de *cut-off* foram selecionados, dentro do IR de cada TG-ROC, e o valor de absorbância mais próximo gerado pela curva ROC foi utilizado em conjunto com os melhores parâmetros para Se, Es e *likelihood ratio* (LR).

A área sob a curva da curva ROC ou *area under ROC curve* (AUC), índice da acurácia diagnóstica, foi calculada e valores próximos a 1 indicam um teste informativo; valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; McNEIL, 1983). Para comparação das AUC, de cada preparado antigênico, que foram derivadas do mesmo painel amostras de soros foi utilizado o método descrito por Hanley e McNeil (1983).

Razão de probabilidade (RP) ou LR indica qual a probabilidade de paciente com neurocisticercose possuir um teste específico positivo comparado com pacientes não infectados pelo parasito; foi estimada como $LR = Se/(1-Es)$ (SOPELETE, 2005).

O índice de reatividade – que expressa os resultados da reatividade dos soros - pela razão entre os valores de absorbância e o *cut-off* (para cada extrato antigênico). Valores de IE >1 foram considerados positivos. Sensibilidade e especificidade foram calculados de acordo com Sopelete (2005). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 - RESULTADOS

4.1 – Seleção dos anticorpos

Moléculas de scFvs ligantes a peptídeos expressos em fagos NC₂2 e NC₄1 e ao S foram isoladas da biblioteca. Este processo ocorreu por dois ciclos de seleção, os quais consistiram em ligações dos scFvs, lavagens dos anticorpos não ligados, eluição e amplificação de clones específicos. Em cada ciclo de seleção contra os peptídeos foi incluído um passo de seleção negativa para retirar os clones que se ligassem a proteínas do fago, para tanto foi utilizado o fago selvagem.

Para obter anticorpos monoclonais com alta afinidade, houve aumento na pressão de seleção mediante aumento na quantidade de lavagens do 1º para o 2º ciclo de seleção (Tabela 1).

Tabela 1 - Títulos obtidos nos dois ciclos de seleção de uma biblioteca scFv expressa em fagos contra antígeno total de metacestódeos de *T. solium* (S) e dois peptídeos expressos em fagos (NC₂2 e NC₄1). Os títulos de entrada e saída, as condições de estringência nas lavagens são mostradas para cada ciclo. Ufc/mL = unidades formadoras de colônias por mL.

Alvo	Ciclo de seleção	Entrada ufc/mL	Saída ufc/mL	Estringência TBS-T
S	1º	2x10 ⁹	2x10 ³	0,05%
	2º	3x10 ⁶	1x10 ³	0,1%
NC ₂ 2	1º	2x10 ⁹	3x10 ⁴	0,05%
	2º	4x10 ⁷	2x10 ³	0,1%
NC ₄ 1	1º	2x10 ⁹	1,1x10 ⁵	0,05%
	2º	6,8x10 ⁸	1,1x10 ³	0,1%

4.2 - Transformação da linhagem de *Escherichia coli* com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção e expressão de moléculas scFv em solução

Fagos presentes no eluato do 2º ciclo de seleção foram amplificados em XL1-Blue, em seguida, os plasmídeos destas bactérias foram extraídos (Figura 5) e utilizados para transformar bactérias Top 10 (Figura 6). A linhagem não supressora (Top 10) foi requerida para expressar moléculas scFv, livres da proteína III viral, em solução.

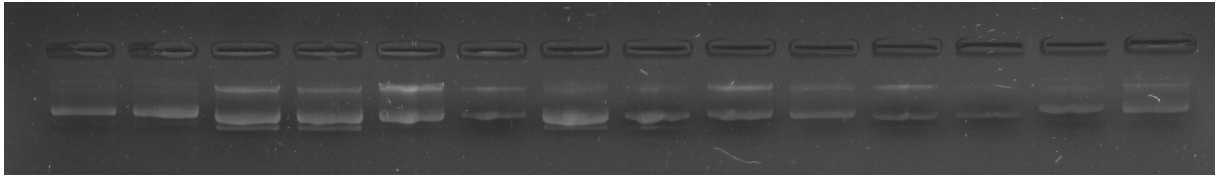


Figura 5 – Análise da extração do DNA plasmidial das bactérias do 2º ciclo de seleção em gel de agarose 0,8%.

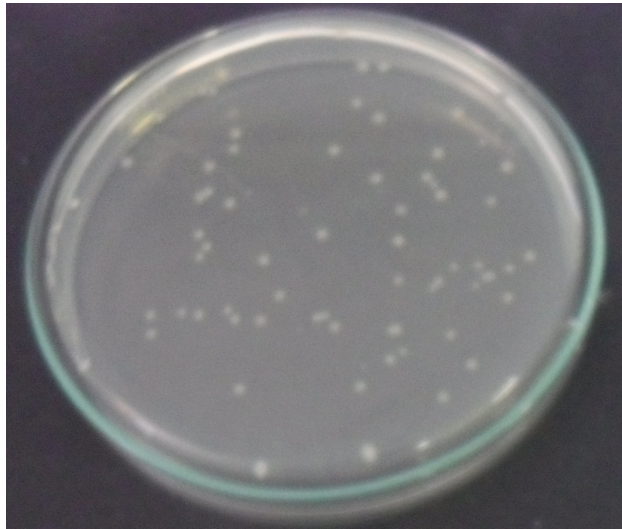


Figura 6 – Linhagem de *E. coli* não supressora Top 10 transformada com fagomídeos provenientes do segundo ciclo de seleção.

Depois de induzidos com IPTG, os clones isolados de bactérias TOP10 transformadas (n= 96 contra cada alvo) foram avaliados por ELISA e *dot blot* quanto à expressão dos scFvs no sobrenadante de cultura, como mostrado nas Figuras 7 e 8.

Os ensaios ELISA e *dot blot* foram realizados, nesse caso, para analisar a expressão dos fragmentos scFv indiretamente pela observação da expressão do epítipo da hemaglutinina (HA) fusionada ao anticorpo clonado no vetor pComb3XSS. O reconhecimento do epítipo HA pelo anticorpo monoclonal anti-HA reflete a expressão deste e, consequentemente, pela sua proximidade ao fragmento scFv, pode-se inferir a integridade de todo o sistema de expressão. Como controle negativo, foi utilizado o sobrenadante de cultura de bactérias TOP10 transformadas com o vetor pComb3XSS vazio e que foram induzidas nas mesmas condições descritas para as bactérias que expressaram os fragmentos de anticorpos. Os controles negativos não exibiram marcação.

Dentre os fragmentos de anticorpos expressos em placas *deep well*, nem todos expressaram o epítipo da hemaglutinina (Figura 6).

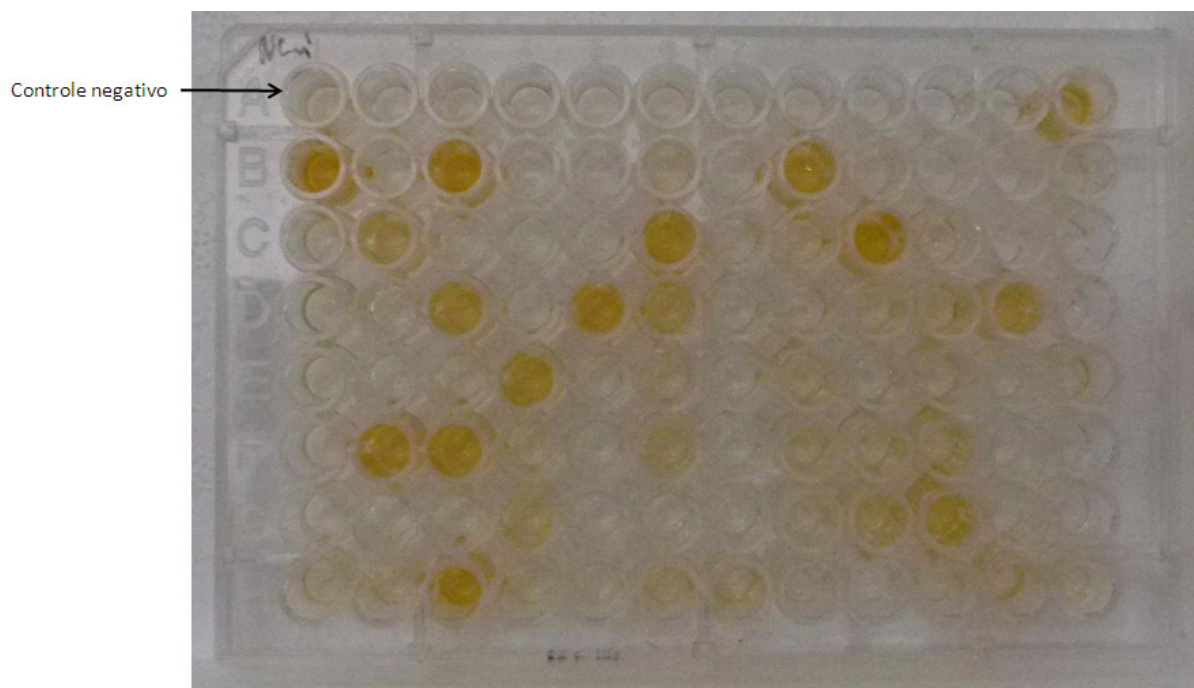


Figura 7 - ELISA de sobrenadante de cultura dos clones induzidos com IPTG após transformação em *E. coli* linhagem TOP 10.

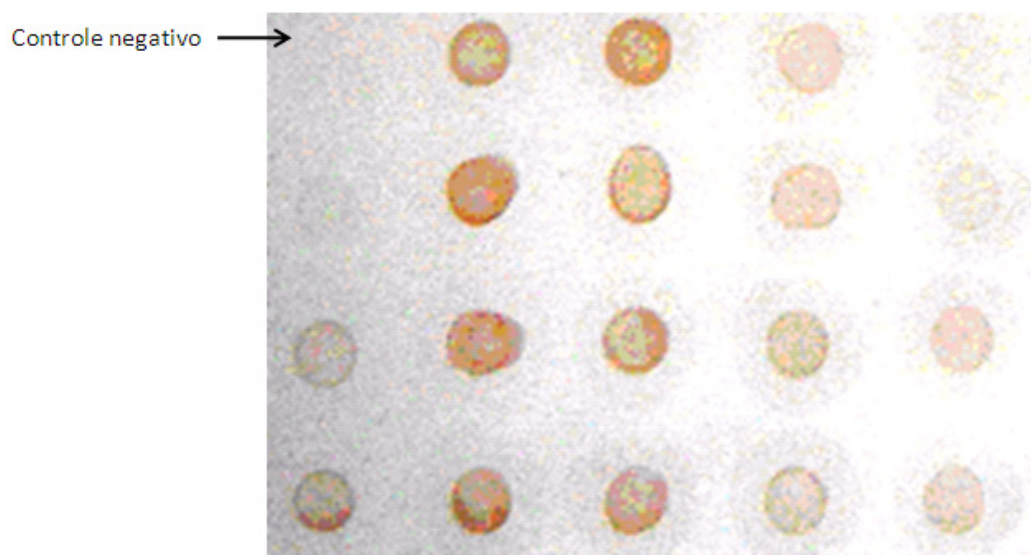


Figura 8 - Análise de *dot blot* do sobrenadante de cultura dos clones induzidos com IPTG.

4.3 - ELISA para seleção dos fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade aos alvos

Os clones positivos, ou seja, expressando o epitopo da hemaglutinina, foram utilizados no ensaio imunoenzimático ELISA para seleção dos fragmentos de anticorpos scFv com maior afinidade ao extrato total e aos peptídeos expressos em fagos NC₂₂ e NC₄₁.

A especificidade foi testada utilizando placas de microtitulação para ELISA (n= 21 clones selecionados contra cada peptídeo e n= 10 clones da seleção contra o S). O clone foi considerado como específico se a DO fosse duas vezes maior que a dos controles negativos (Figura 9).

O ensaio imunoenzimático ELISA possibilitou a seleção de seis fragmentos de anticorpos com maior afinidade aos alvos, dois clones para cada. Os resultados foram analisados quanto à DO do clone em relação à do PBS-BSA 3%, para os clones específicos ao S, ou a DO o fago selvagem para os clones selecionados contra os peptídeos expressos em fagos. Os fragmentos de anticorpos A1 e A4 selecionados para o extrato salino total, B6 e E4 para o peptídeo NC₂₂ e G10 e H12 relativos ao NC₄₁ mostraram maiores reatividades (Figura 8).

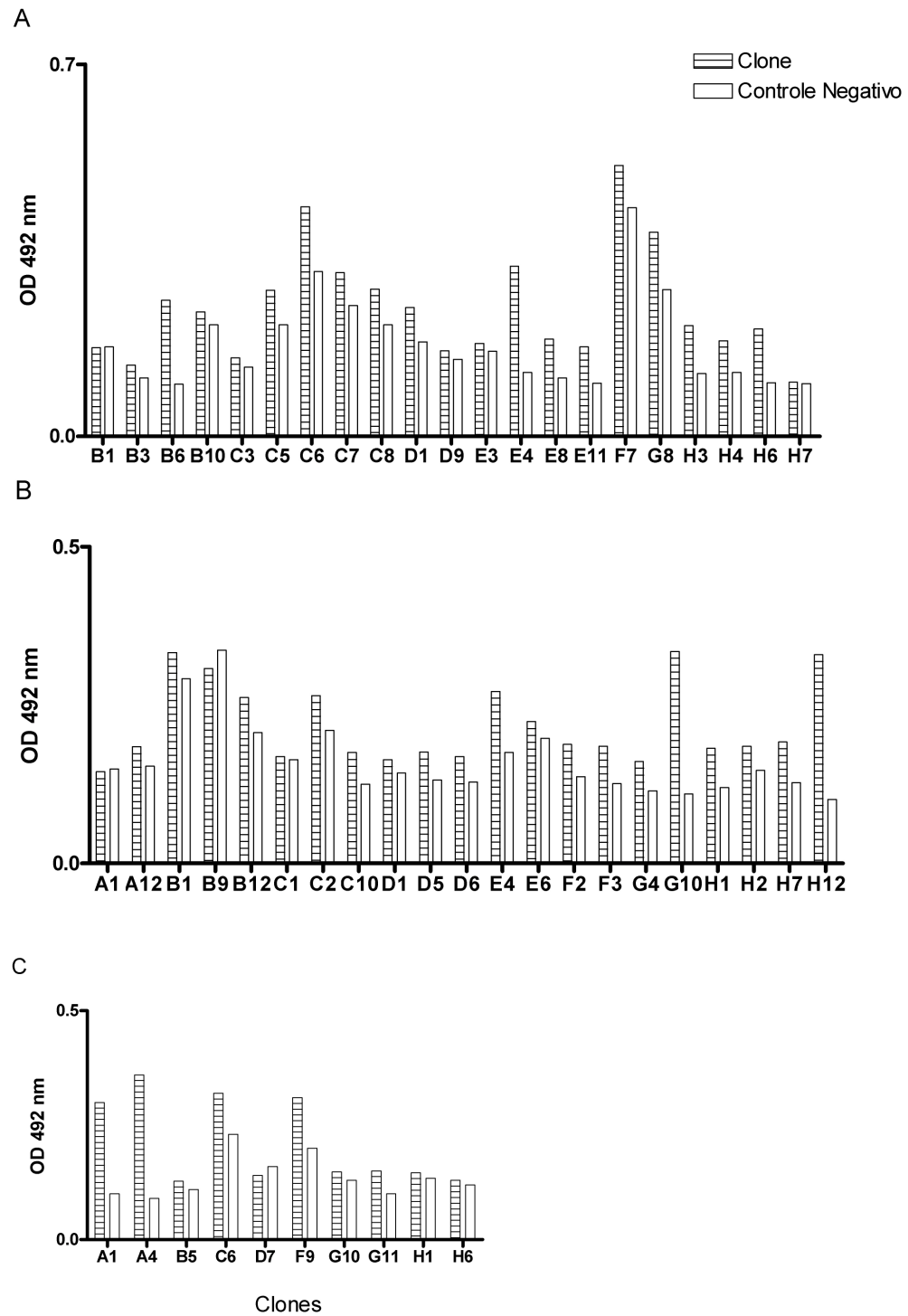


Figura 9 – ELISA para análise da reatividade dos scFvs selecionados. As colunas com linhas horizontais representam a reatividade dos clones ao alvo. A- Clones selecionados contra o fago NC₂, B – NC₄1 e C – antígeno salino total de metacestódeos de *T. solium*. As colunas em branco representam reatividade dos clones ao fago selvagem (A, B) e PBS-BSA 3% (C).

4.4 - Purificação de scFv por cromatografia de afinidade em HPLC e análise das frações eluídas

Após a expressão dos clones em sobrenadante de cultura, os mesmos foram purificados em sistema HPLC. As frações eluídas foram analisadas em um ensaio de *dot blot*, aquelas com maior reatividade foram colocadas em um mesmo tubo, concentradas e dessalinizadas em amicon 3kDa.

Aliquotas das frações concentradas foram submetidas à SDS-PAGE 16% e WB para identificar sua pureza e massa molecular. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do teste de reconhecimento do scFv pelo anticorpo anti-HA (marcado com peroxidase). Todos os anticorpos purificados mostraram apenas uma banda com o tamanho esperado de aproximadamente 29kDa. A ausência de outras bandas indicou que não houve degradação dos scFvs durante a purificação (Figura 10).

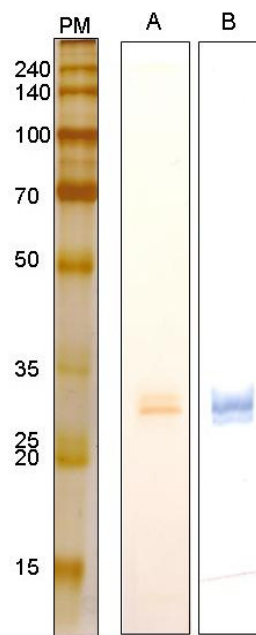


Figura 10 - Análise do perfil eletroforético dos clones selecionados em SDS-PAGE 16% (A) e *western blotting*, o clone purificado por cromatografia foi reconhecido pelo anticorpo anti-HA (marcado com peroxidase) na posição de aproximadamente 29 kDa (B).

No teste *Dot blot* todos os clones selecionados mostraram ser específicos contra seu respectivo alvo (Figura 11). No WB utilizando extrato salino total nenhuma banda foi reconhecida pelos clones sugerindo que estes reconheçam proteínas conformacionais.

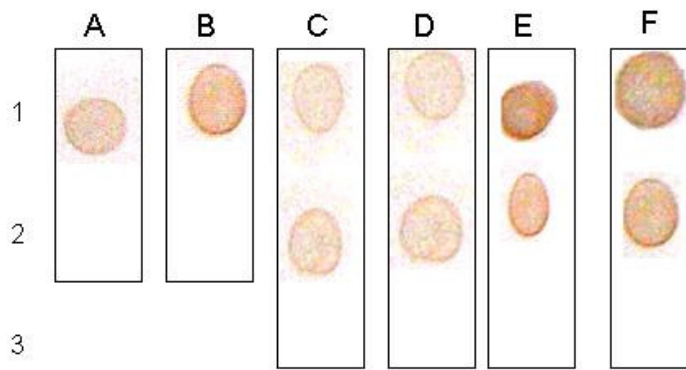


Figura 11 - Verificação da especificidade dos clones selecionados ao alvo 1- Antígeno total, 2 (A e B) - PBS, C-F (peptídeo exposto em fago), 3 (C-F) – Fago selvagem. scFvs: A1 (A), A4 (B), B6 (C), E4 (D), G10 (E), H12 (F).

Após a realização de testes ELISA e *dot blot* para verificar a especificidade, um clone contra cada alvo (A4 – S, B6 – NC₂2 e G10 – NC₄1) foi selecionado para maiores análises.

4.5– Localização por imunofluorescência dos antígenos reconhecidos pelos clones selecionados

Para confirmar a reatividade e determinar o padrão de expressão cada clone foi avaliado por imunofluorescência utilizando secções da forma metacestódea de *T. solium*. Os clones de scFv foram incubados com o cisticerco e a ligação dos scFv foi visualizada por imunofluorescência indireta após incubação com anticorpo secundário anti HA-FITC. Nenhuma fluorescência foi verificada nos controles negativos. O padrão encontrado para todos os clones foi desigual, distribuído sem regularidade, porém claramente distintos (Figura 12). Apenas para o clone B6 foi observada uma imunorreatividade preferencialmente nas áreas de tegumento (Figura 12 B).

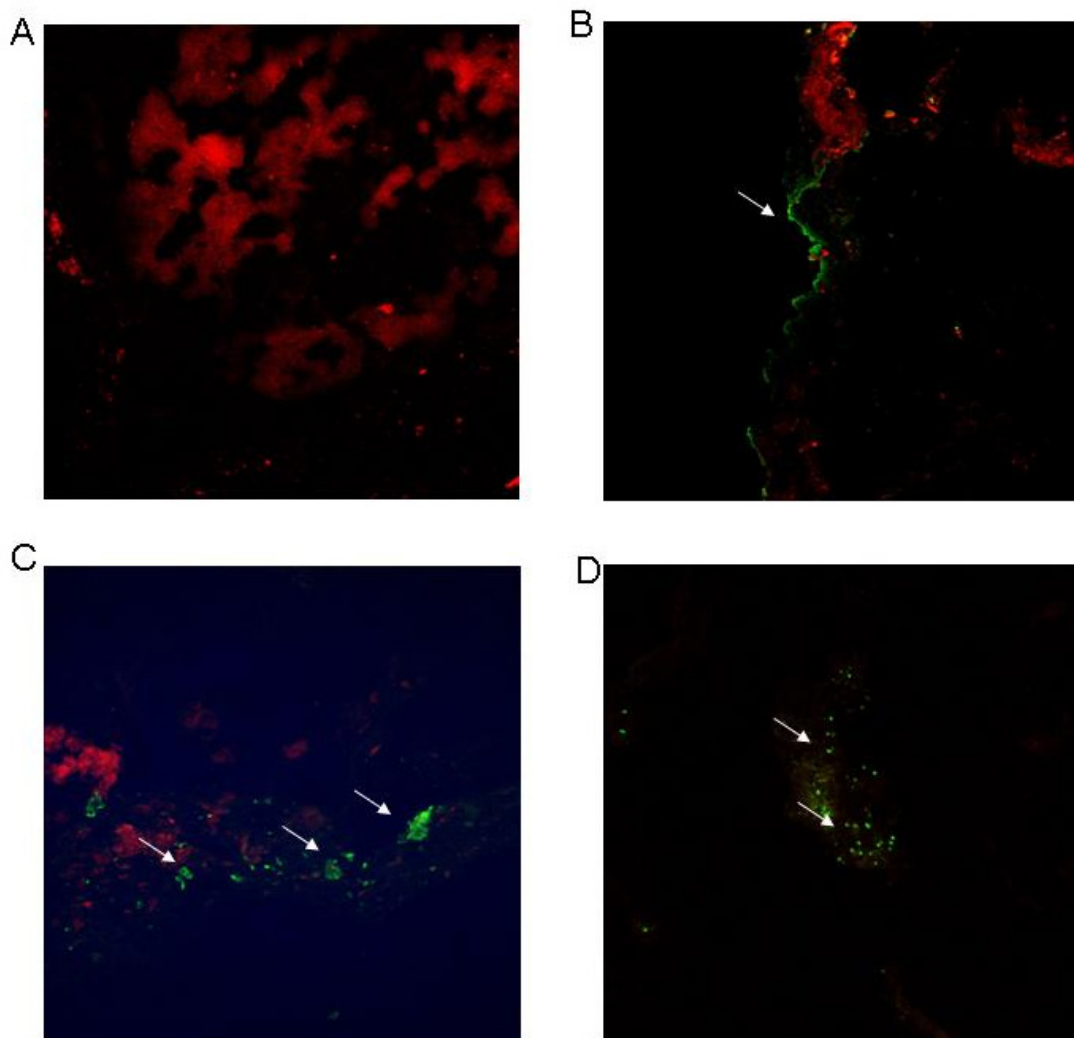


Figura 12 – Imunofluorescência do cisticerco de *T. solium* para imunolocalização dos antígenos reconhecidos por cada clone de scFv selecionado. A ligação foi observada pela utilização de anti HA marcado com FITC, por microscopia de fluorescência (A) negativo, (B) B6, (C) A4 e (D) G10.

4.6 - Sequenciamento dos clones selecionados

Cada clone possui uma sequência diferente como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de aminoácidos dos anticorpos selecionados. Os CDRs (1 a 3) encontram-se sublinhados.

Cadeia Leve	
Clone	Sequencia
A4	MTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA ^{WYQQKPGQASQAPHL} <u>*CIQQGH</u> HPSQVQWQ*GLGQTSLSPSAA*SLKILQFITV SSVALAVDVGKDSEI
B6	MTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYWYLQKPGQSPQLLIYWYLQKPGQS <u>PQLLIYVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTRTFGPGTKVDIK</u>
G10	VQLLESGAEVKKPGSSVKVSCRASGGTFN ^{NYAIS} WVRQAPGQGLEWMGGIFPFR <u>XTXXXTSRA</u> XSPLPRTNXXXTWX*AXCXLRTXPX TATTAMTGRGCSWKK <u>RGYDFWSDHGILRYGRLGP</u>
Cadeia Pesada	
Clone	Sequencia
A4	VMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA ^{WYQQKPGQAPRLIYDASN} RAT <u>GIPARFSGSGSGTDFTLTIS</u> SLEPEDFAVYYCQORSNWPWTFGOGTKVEIK
B6	VQLLESGAEVKKPGSSVKVSCRASGGTFN ^{NYAIS} QCMPSA ^{WVRQAPGQGLEWM} GGIFPFRNTAKYAQH ^{FQGRVTITADESTGTAYMELSSLRSEDTAIYYCARGDTIFG} <u>VTMGYYAMDVWGQGT</u> TVTVS
G10	*LVESGPEVKKPGT ^{SVKVSCKTSGFSFTSYAVQWVRQARGQRLEWIGWIVV} GSGQ <u>TNYAQSFHERVTITRDMSTSTVYMLSSLRSEDTAVYYCAADQSAALPPLFVG</u> FDP <u>LGPGNPGHCLL</u>

4.7 – Caracterização dos antígenos verdadeiros

Após o acoplamento dos clones de anticorpos selecionados na resina de níquel, o extrato salino total foi incubado para que os antígenos específicos a cada anticorpo fossem capturados. Após eluição com imidazol a fração resultante foi enviada para caracterização. As frações foram ainda analisadas por SDS-PAGE 16% (Figura 13).

Pode-se observar que os eluatos apresentam perfis semelhantes, porém ao se avaliar pelo programa Image J observa-se que o padrão de picos apresentados possuem algumas diferenças.

O sequenciamento revelou proteínas diferentes para cada clone, o antígeno verdadeiro para cada um é demonstrado na Tabela 3 abaixo.

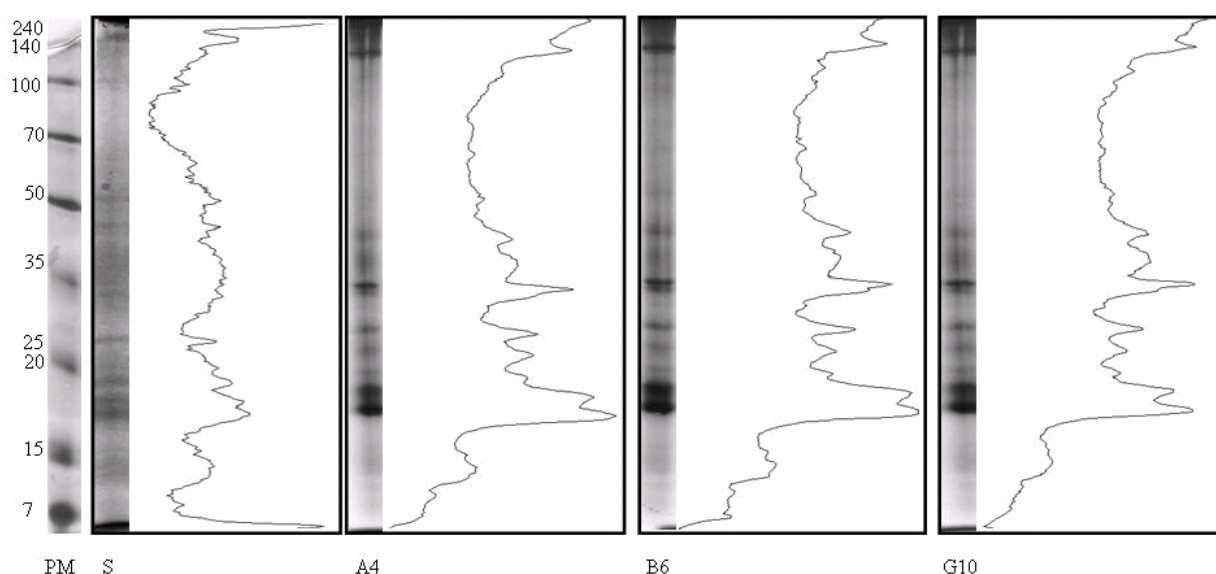


Figura 13- Perfil eletroforético em SDS-PAGE 16% (corado por nitrato de prata) dos antígenos capturados a partir do antígeno salino total de metacestódeos de *T. solium* pelos clones A4, B6 e G10.

Tabela 3 – Dados do sequenciamento por LC MS/MS. São mostradas as proteínas alvo de cada clone, ou seja, o antígeno verdadeiro.

Clone	n. Acesso	Descrição	Gene	PM (kDa)
A4	G3GE64	Ts18 variant 2	Ts18v2	9,455.10
B6	P68555	Actin	ACT1	41,727.50
G10	D2U5C3	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	pepck	54,088.40

4.8 – Fracionamento do extrato salino total por cromatografia de troca iônica

Com o conhecimento da limitação da sorologia pela reatividade cruzada quando se utiliza extratos antigênicos totais, foi realizado o fracionamento do antígeno total em resina catiônica DEAE. As frações resultantes foram testadas por ELISA com amostras de soro de três grupos de pacientes. A fração com melhores parâmetros diagnósticos foi utilizada para posterior fracionamento utilizando os clones de anticorpos selecionados. Como os clones foram selecionados contra peptídeos expressos em fago com altos valores de eficiência diagnóstica, pretendeu-se capturar antígenos altamente eficientes.

A Figura 14 mostra os perfis eletroforéticos do extrato salino e das frações obtidas após o fracionamento em resina de troca iônica.

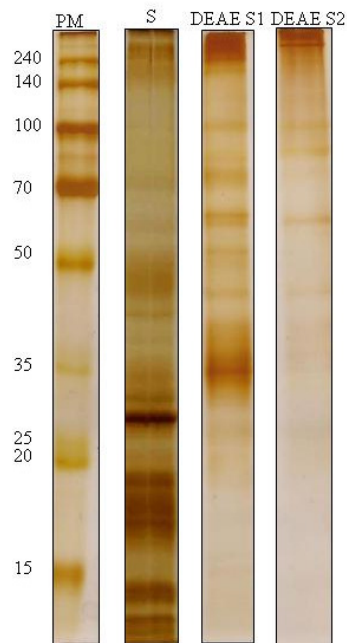


Figura 14 - Perfis eletroforéticos do extrato salino total de formas metacestódeas de *T. solium* (S) e frações obtidas, em resina sepharose dietilaminoetil celulose – DEAE (DEAE S1 e a DEAE S2, a qual interagiu com a resina), em SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

A Figura 15 apresenta todas as amostras testadas por ELISA utilizando o S e as frações antigênicas obtidas por fracionamento em resina de troca iônica. No Grupo 1, 87,5% (35/40) das amostras foram positivas para o extrato salino total (S), 87,5% (35/40) para a fração DEAE S1 e 90% (36/40) para a fração DEAE S2. No Grupo 2, 20% das amostras (8/40) foram positivas para o S e para as frações DEAE S1 e S2 foram 12,5% (5/40). No Grupo 3, o percentual de amostras positivas para S, DEAE S1 e DEAE S2 foi 5% (2/40), 2,5% (1/40) e 0% (0/40), respectivamente.

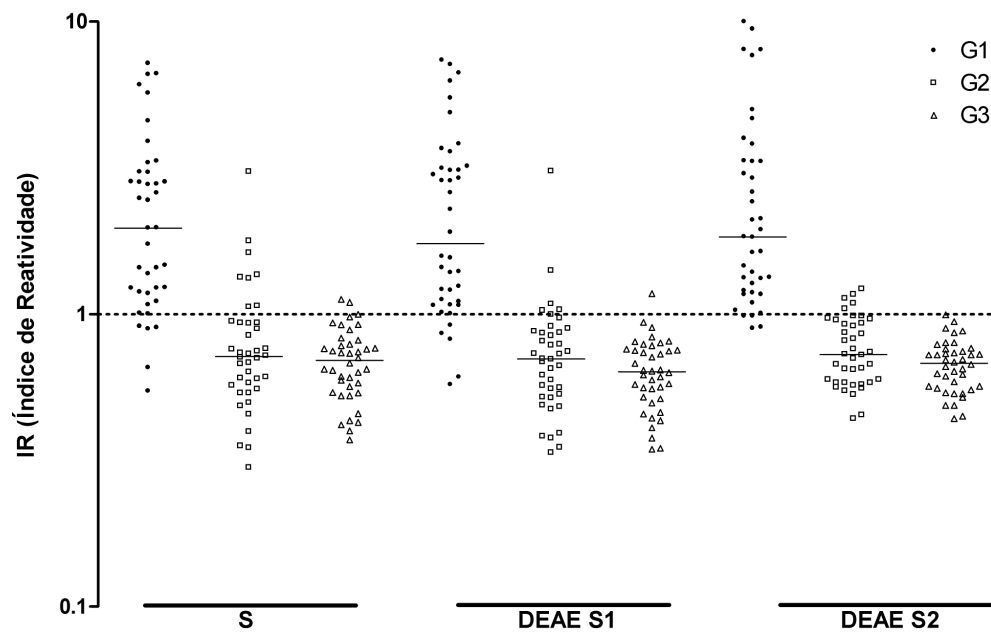


Figura 15 - Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soros de pacientes com NC (G1; n = 40), outras parasitoses (G2; n = 40) e indivíduos saudáveis (G3; n = 40) analisadas por ELISA, utilizando o extrato salino total (S) de *T. solium*, e suas frações DEAE S1 (que não interagiu com a resina) e DEAE S2 (que interagiu com a resina). Linha pontilhada indica o índice reatividade (IR); linha contínua refere-se à mediana do grupo.

A reatividade cruzada pelo teste ELISA no G2 para o antígeno S foi observada para amostras de pacientes infectados por: ancilostomídeo (1/8), *A. lumbricoides* (3/8), *S. stercoralis* (1/8), *H. nana* (1/8), *S. mansoni* (2/8). Para a fração DEAE S1 a reatividade cruzada foi com amostras de pacientes com *S. stercoralis* (1/5) e *H. nana* e *S. mansoni* (2/5), cada. Para a fração DEAE S2 a reatividade cruzada encontrada foi para amostras de *Taenia* sp (1/5), *H. nana* (2/5), *S. mansoni* (1/5).

A Figura 16 mostra as curvas ROC com a seleção de *cut-off* por TG-ROC com a combinação de sensibilidade e especificidade, além dos valores de AUC e LR. De acordo com o critério de corte estabelecido por TG-ROC para o S, a sensibilidade foi de 87,5% para S e DEAE S1 e 90% para DEAE S2. Houve um aumento da especificidade do S (87,5%) para a DEAE S2 (93,8%).

Analisando a curva ROC (Figura 16), a fração DEAE S2 é satisfatoriamente eficiente na discriminação entre pacientes com NC e grupos controle (G2 e G3). O desempenho do teste, indicado pela área sob a curva (AUC), para a fração DEAE S2 quase atingiu o valor máximo (1,00) de eficiência, detendo valor igual a 0,981. O cálculo da *likelihood ratio* (LR) conferiu à detecção de IgG a melhor probabilidade de um resultado do ensaio ser relacionado com a existência de NC ou de resposta imune funcional. Para o S e a fração DEAE S1 a LR

foi de 7,0 e 11,7, respectivamente, indicando um valor moderado. Contudo, para a fração DEAE S2 a LR obtida, foi de alto valor diagnóstico, igual a 14,4.

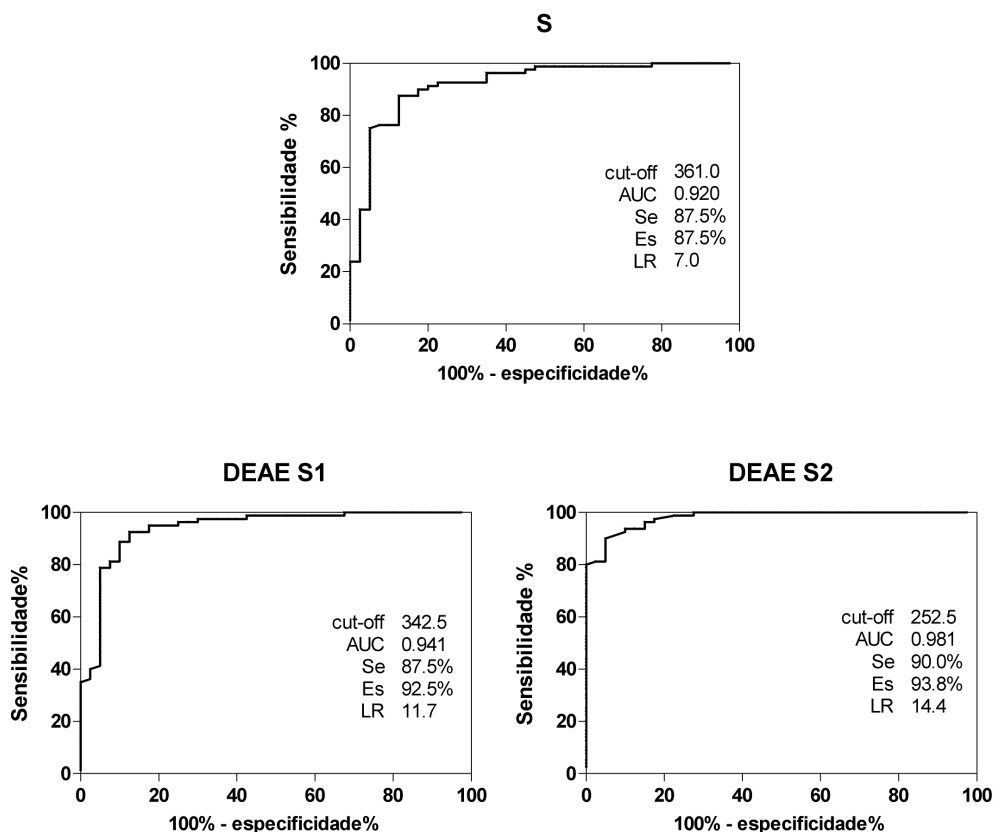


Figura 16 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*área under curve*; AUC) e razão de probabilidade (*likelihood ratio*; LR) para extrato salino total (S) e suas frações DEAE S1 e DEAE S2 na detecção de IgG em amostras de soro.

4.9 – Captura de novos antígenos e aplicação na detecção de IgG em amostras de soro

As Figuras 17 e 18 mostram os perfis eletroforéticos e análise pelo programa Image J, do extrato salino total e frações capturadas a partir dele e DEAE S2 e frações capturadas a partir da mesma, respectivamente.

A Figura 19 apresenta todas as amostras testadas por ELISA utilizando o S, DEAE S2 e as frações antigênicas capturadas pelos clones de anticorpos G10, A4 e B6 nos grupos 1, 2 e 3. Analisando a Figura 18 A, foram observadas taxas de positividade no Grupo 1 de 80% (24/30) para S, 97% (29/30) para o antígeno capturado pelo clone G10 e 100% (30/30) e 97% (29/30) para os antígenos correspondentes aos clones A4 e B6, respectivamente. No Grupo 2, 26,6% (8/30) das amostras foram positivas para o S, 3,3% (1/30) para a captura do

clone A4 e 6,6% para o B6, nenhuma amostra foi positiva para o antígeno referente ao clone G10. No Grupo 3 a positividade foi de 6,6% para o S e captura do clone G10 e 3,3% (1/30) para os clones A4 e B6.

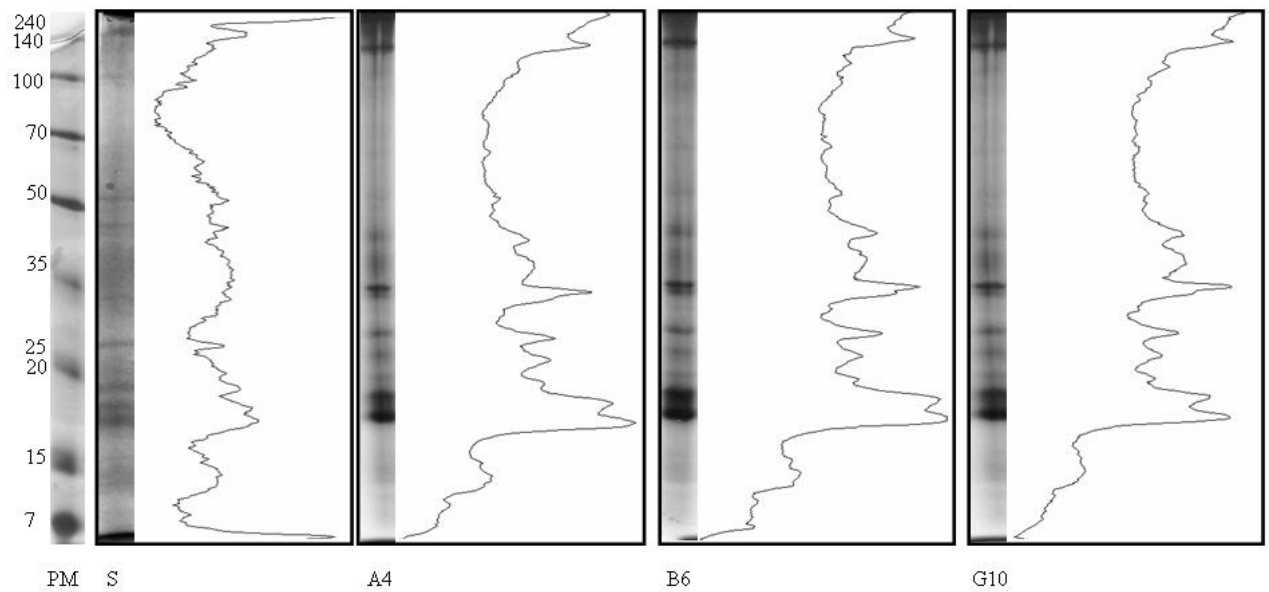


Figura 17 - Perfis eletroforéticos por SDS PAGE 16% e análise dos mesmos pelo programa Image J do extrato salino total de formas metacestódeas (S) e frações obtidas após captura antigênica pelos clones A4, B6 e G10 em SDS-PAGE, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

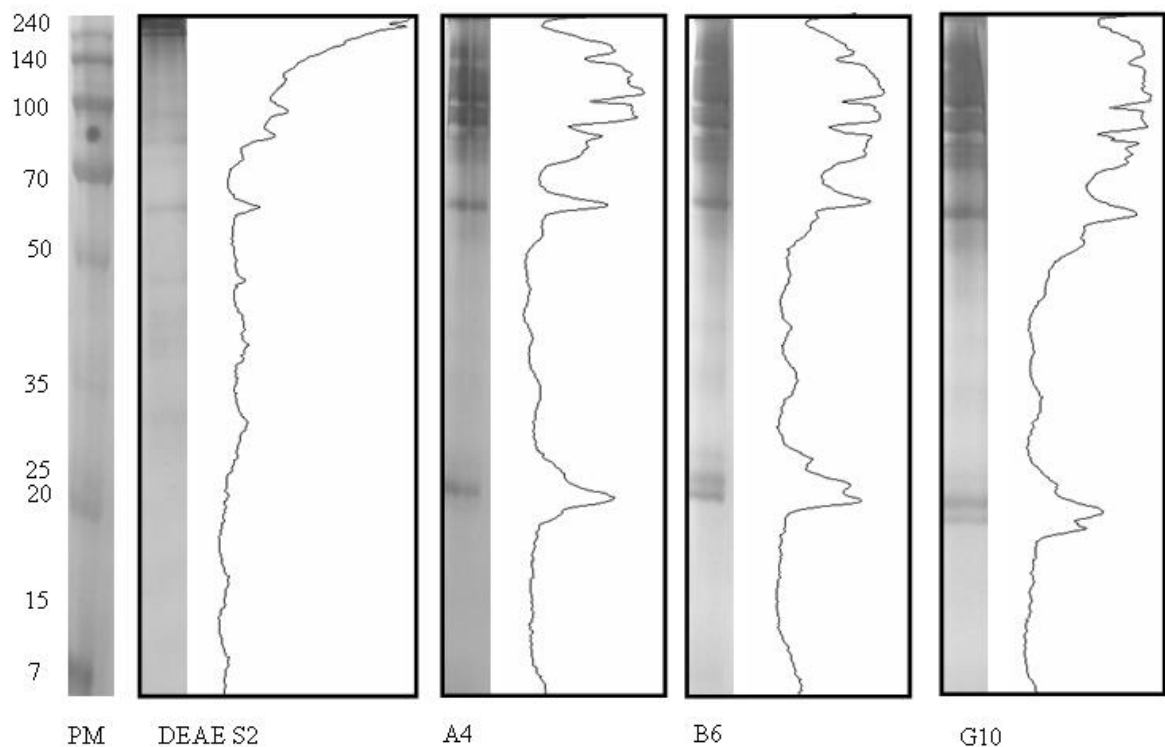


Figura 18 - Perfis eletroforéticos por SDS PAGE 12% e análise dos mesmos pelo programa Image J da fração DEAE S2 e frações obtidas após captura antigênica pelos clones A4, B6 e G10 em SDS-PAGE, corado com nitrato de prata. PM – padrão de massa molecular em kilodaltons (kDa).

Na Figura 19 B, para o Grupo 1 as positivities foram: 83,3% para fração DEAE S2, e para as capturas: 96,7% para clone G10, 93,3% para A4 e 100% para B6, respectivamente. No Grupo 2, foram observadas as seguintes taxas de positividade: 13,3% para DEAE S2 (4/30) e para os antígenos capturados: 3,3% (1/30) para G10, 10% (3/30) para A4 e 6,6% (2/30) para B6, respectivamente. No Grupo 3, nenhuma amostra foi positiva para DEAE S2 e para o antígeno capturado pelo clone B6 e 3,3% (1/30) para antígenos referentes aos clones G10 e A4.

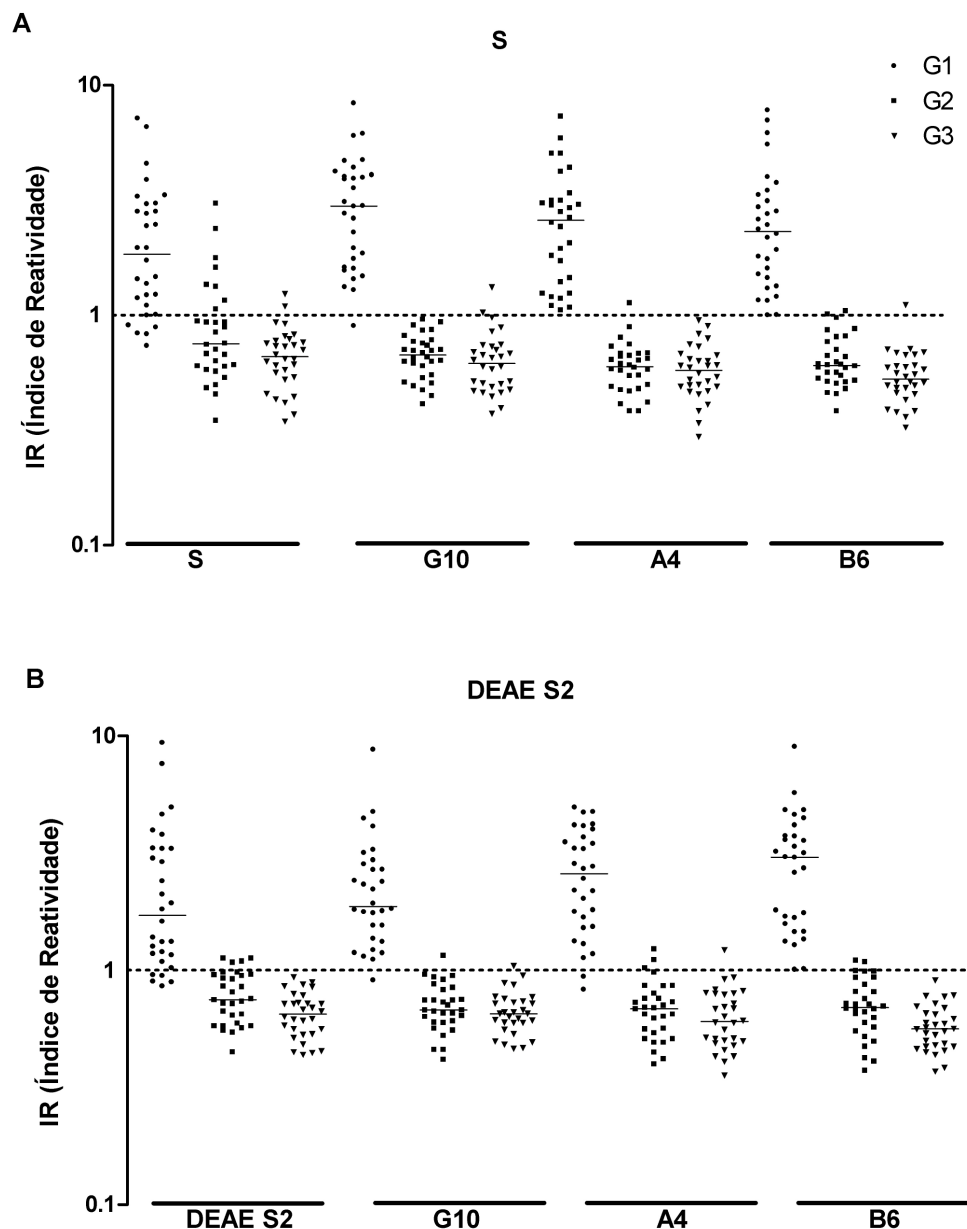


Figura 19 - Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soros de pacientes com NC (G1; n = 30), outras parasitoses (G2; n = 30) e indivíduos saudáveis (G3; n = 30) analisadas por ELISA. A= Amostras testadas utilizando extrato salino total (S) de *T. solium* e os antígenos capturados pelos clones G10, A4 e B6. B= Amostras testadas utilizando fração DEAE S2 e os antígenos capturados pelos clones G10, A4 e B6. Linha pontilhada indica o índice reatividade (IR); linha contínua refere-se à mediana do grupo.

Para o extrato S e os antígenos capturados a partir deste extrato pelos clones, a reatividade cruzada de acordo com o teste ELISA no G2 ocorreu para amostras de: ancilostomídeo (2/8), *A. lumbricoides* (4/8), *S. stercoralis* (1/8), *H. nana* (1/8), *S. mansoni* (1/8). Nenhuma amostra foi positiva para o antígeno capturado pelo clone G10. Para antígeno capturado por A4 houve reatividade com amostra de *E. vermicularis* (1/1) e para B6 as amostras positivas eram de pacientes com *A. lumbricoides* (1/2) e *S. mansoni* (1/2).

Para a fração DEAE S2 e os antígenos capturados a partir desta, as amostras com reatividade cruzada eram de ancilostomídeo (1/4), *A. lumbricoides* (1/4), *H. nana* (2/4) para a fração DEAE S2, *E. vermicularis* (1/1) para a captura do clone G10 e *E. vermicularis*, *H. nana* e *S. mansoni*, uma amostra de cada para o clone A4; para o antígeno capturado pelo clone B6 as amostras positivas eram de pacientes com *Taenia* sp (1/2) e *S. mansoni* (1/2).

As diferenças na positividade foram acompanhadas de diferenças estatísticas significantes nos níveis de IgG detectados. Com relação aos antígenos capturados a partir do extrato S foram encontradas diferenças na mediana do IR. No G1 o antígeno capturado pelo clone G10 se mostrou mais eficiente que o antígeno S ($p=0,0001$) e superior àquele do clone B6 ($p=0,0005$). No G2 os antígenos capturados pelos clones A4 e B6, se mostraram mais específicos que o extrato S com valores de $p=0,0027$ e $0,0025$, respectivamente. Quando se comparou os antígenos dos clones G10 e A4, este último se mostrou mais eficiente ($0,0004$).

Quando se avaliou a fração DEAE S2 e os antígenos capturados a partir dela diferenças significativas só foram encontradas entre antígenos do clone G10 e B6 ($p=0,0008$).

A Figura 20 mostra as curvas ROC com a seleção de *cut-off* por TG-ROC, valores de sensibilidade e especificidade, além de AUC e LR. De acordo com o critério de corte estabelecido por TG-ROC para o S e para as frações capturadas a partir deste extrato, a especificidade foi de 83,3% para S e para as frações capturadas por G10, A4 e B6, respectivamente: 97%, 98,3% e 95%.

Analisando a curva ROC (Figura 20 C), a fração capturada pelo clone A4 se demonstrou a mais eficiente na discriminação entre pacientes com NC e grupos controle (G2 e G3). O desempenho do teste, indicado pela área sob a curva (AUC), para esta fração quase atingiu o valor máximo (1,00) de eficiência, detendo valor igual a 0,998. O cálculo da *likelihood ratio* (LR) conferiu a esta fração alto valor diagnóstico com valor de 60,0.

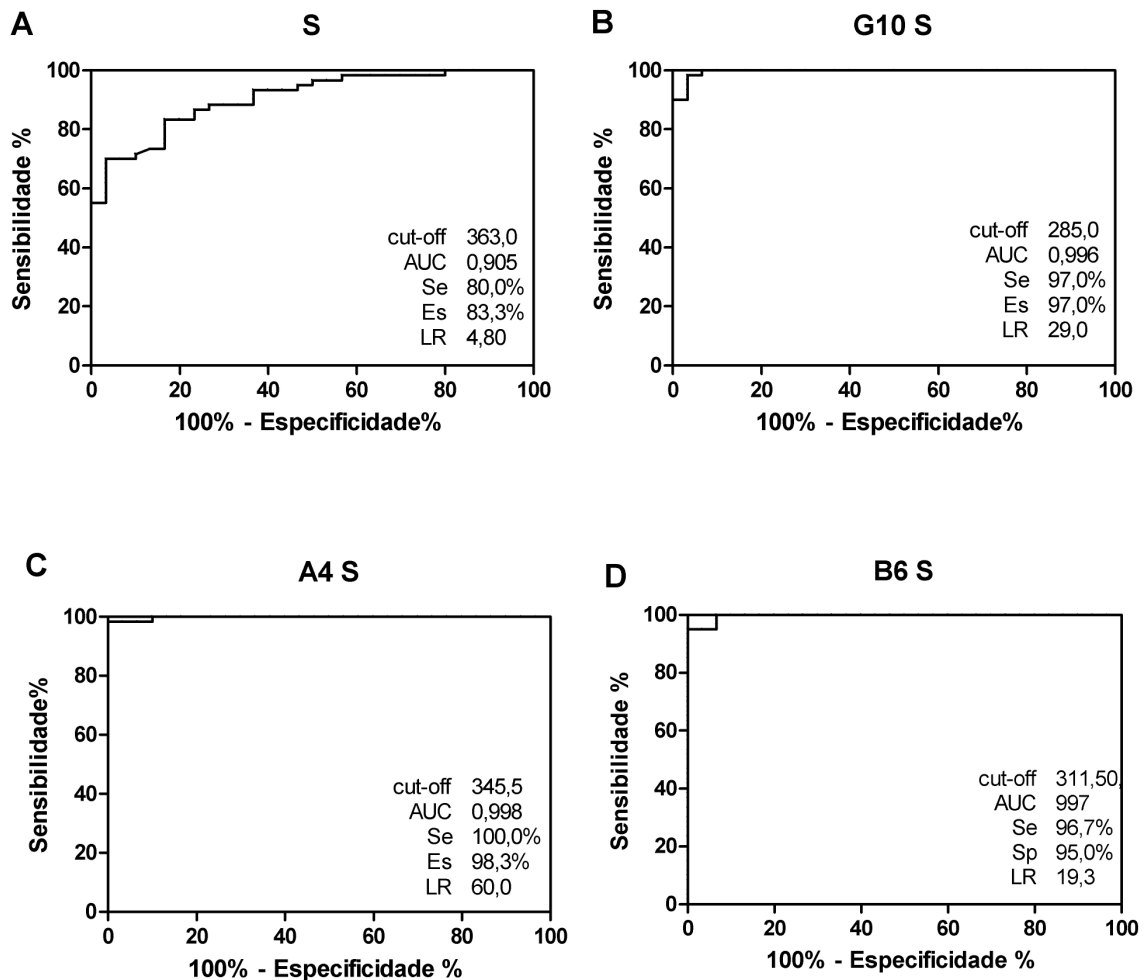


Figura 20 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*área under curve*; AUC) e razão de probabilidade (*likelihood ratio*; LR) para extrato salino total (S) (A) e os antígenos capturados a partir dele pelos clones G10 (B), A4 (C) e B6 (D) na detecção de IgG em amostras de soro.

A Figura 21 mostra as curvas ROC com a seleção de *cut-off* por TG-ROC, valores de sensibilidade e especificidade, além de AUC e LR. De acordo com o critério de corte estabelecido por TG-ROC para a fração DEAE S2 e antígenos capturados a partir dela, a sensibilidade foi de 93,3% para S e para as frações capturadas por G10, A4 e B6, respectivamente: 96,7%, 93,3% e 96,7%.

Analizando a curva ROC (Figura 21 D), a fração capturada pelo clone B6 se demonstrou a mais eficiente na discriminação entre pacientes com NC e grupos controle (G2 e G3). O desempenho do teste, indicado pela área sob a curva (AUC), para esta fração quase atingiu o valor máximo (1,00) de eficiência, detendo valor igual a 0,998. O cálculo da *likelihood ratio* (LR) conferiu a esta fração alto valor diagnóstico com valor de 30,0.

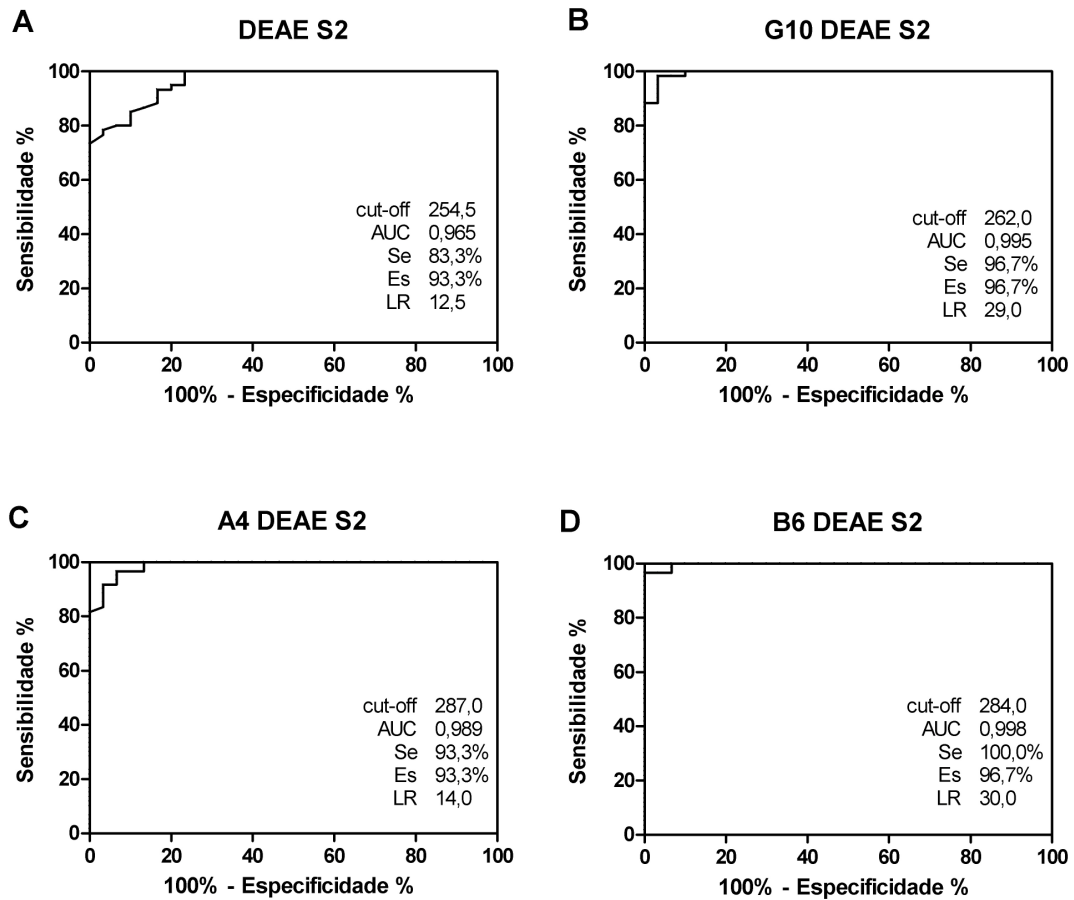


Figura 21 - Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*área under curve*; AUC) e razão de probabilidade (*likelihood ratio*; LR) para a fração DEAE S2 (A) e os antígenos capturados a partir dele pelos clones G10 (B), A4 (C) e B6 (D) na detecção de IgG em amostras de soro.

A Figura 22 mostra o padrão de reconhecimento de bandas por *western blotting* obtido quando se utilizou as frações capturadas a partir do extrato salino total na detecção de IgG em *pool* de amostras de soro de pacientes com NC. O *pool* de amostras de indivíduos saudáveis não reagiu com nenhuma fração. De acordo com os dados da espectrometria de massas a banda correspondente à marcação apresentada por todos os clones se refere a proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinase (peso molecular teórico de 54kDa).

A Figura 23 mostra o padrão de reconhecimento de bandas os antígenos capturados a partir da fração DEAE S2 pelos 3 clones selecionados, A4, B6 e G10. Novamente podemos observar a marcação da banda correspondente à fosfoenolpiruvato carboxiquinase, outra banda com aproximadamente 100 kDa, reconhecida pelos clones A4 e G10, foi reconhecida ainda outra banda com aproximadamente 120 kDa (A4 e G10) . Como não foi realizada a

espectrometria de massas para estas frações não podemos dizer ao certo a que proteínas se referem estas bandas.

Observa-se dois padrões de reconhecimento um para as frações capturadas a partir do extrato S e outro para aquelas referentes à DEAE S2.

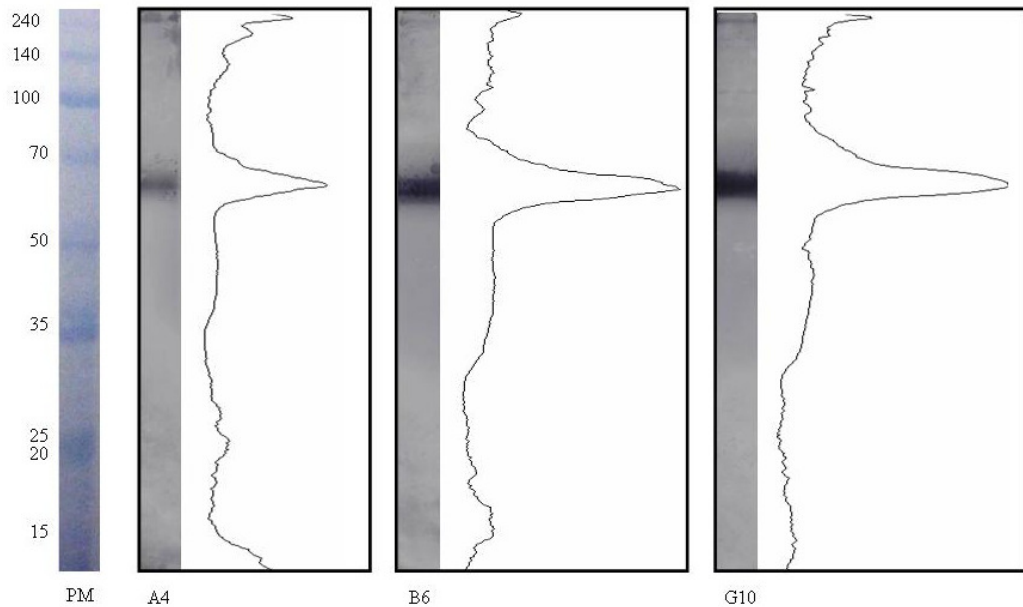


Figura 22 - Western Blotting utilizando *pool* de amostras de soro de pacientes com NC frente às frações antigênicas capturadas a partir do extrato salino total das formas metacestódeas de *T. solium* (S) analisadas pelo programa Image J. Foram utilizados os clones A4, B6 e G10.

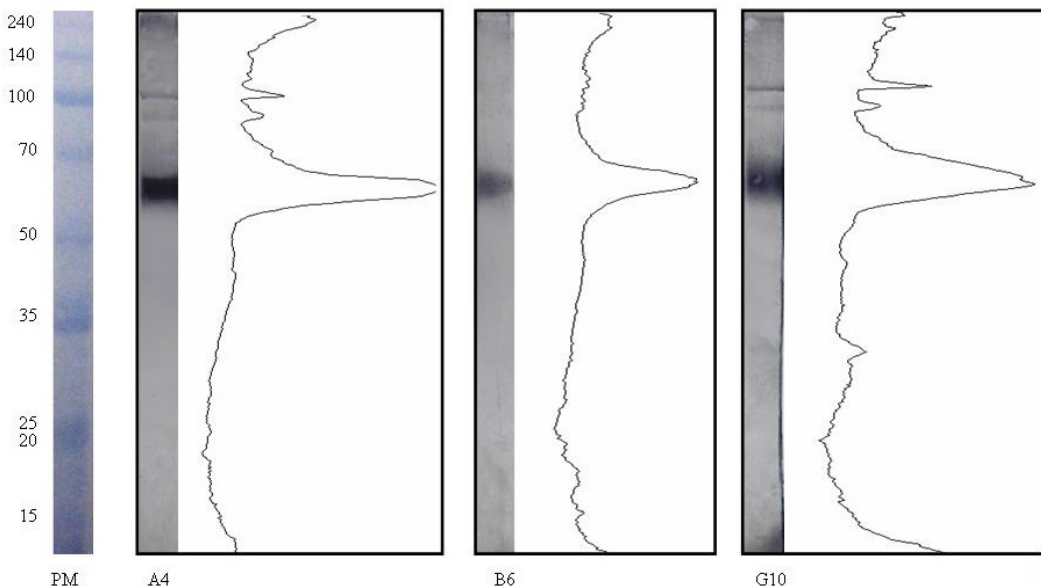


Figura 23 - Western Blotting utilizando *pool* de amostras de soro de pacientes com NC frente às frações antigênicas capturadas a partir da fração DEAE S2, analisadas pelo programa Image J. Foram utilizados os clones A4, B6 e G10.

5 - DISCUSSÃO

Os anticorpos representam uma ferramenta efetiva tanto em estratégias terapêuticas como diagnósticas para várias doenças. Fragmentos de anticorpos recombinantes, tais como moléculas scFvs, vêm se tornando uma alternativa ao uso de anticorpos monoclonais completos, uma vez que são menores, possuem algumas particularidades que são vantajosas em certas aplicações clínicas, como por exemplo a grande variabilidade, sua produção é mais econômica e são mais facilmente manipulados (WEISSER; HALL, 2009).

Diversos fragmentos de anticorpos têm sido desenvolvidos por meio da tecnologia de *Phage display* visando diferentes objetivos, contudo, não foi encontrada na literatura nenhuma referência ao uso de fragmentos de anticorpos scFv para seleção de antígenos verdadeiros relativos a peptídeos expostos em fagos, nem da utilização destes anticorpos para captura de novos antígenos com aplicação no diagnóstico da NC.

A seleção de anticorpos scFv que reconheçam os peptídeos expressos em fagos não é uma tarefa convencional. A estratégia utilizada neste trabalho foi selecionar anticorpos scFv que reconhecessem os peptídeos expostos em fagos, NC₂2 e NC₄1, previamente selecionados por Ribeiro, 2009, e o extrato salino total (S) para identificar o antígeno verdadeiro utilizando as moléculas scFv selecionadas.

Neste estudo optamos por realizar apenas dois ciclos de seleção, a literatura recomenda a realização de mais de um ciclo de seleção para que haja enriquecimento de um ligante específico além da seleção de fagos não cognatos devido ao fato de as células hospedeiras infectadas e sua progênie produzirem apenas 10^4 - 10^5 moléculas de fagos (SERGEEVA et al., 2006). Geralmente, a razão entre ligantes específicos e não específicos após um ciclo de seleção, é inicialmente, de duas ou três ordens de magnitude e é superada por ciclos de seleção sequenciais.

A fim de comprovar se os anticorpos scFv selecionados após dois ciclos de seleção reconheciam os peptídeos e não o fago, foram realizados ensaios imunoenzimáticos utilizando o fago selvagem, para verificar a especificidade dos anticorpos selecionados. Os resultados mostraram que os anticorpos selecionados reconheceram especificamente o peptídeo e não proteínas do capsídeo do fago.

Foi demonstrado por Shanmugam et al., (2011) que mimotopos selecionados a partir de bibliotecas de peptídeos expostos em fagos podem ser sintetizados e utilizados como alvos na seleção de anticorpos scFv utilizando bibliotecas de anticorpos expostos em fagos na obtenção de anticorpos altamente sensíveis e reativos à seus alvos. É importante enfatizar que

para não ter que realizar a síntese de peptídeos e perder a verdadeira identidade e reatividade dos mimetopos, devido à uma provável conformação com parte da proteína pIII do fago, optamos pela seleção direta contra os fagos recombinantes e neste caso realizamos uma subtração preliminar contra o fago selvagem. Nossos resultados demonstram que obtivemos sucesso nas seleções diretas contra nossos fagos recombinantes com alta eficiência.

Os dados da imunofluorescência demonstraram a funcionalidade dos anticorpos selecionados, uma vez que os mesmos foram capazes de se ligar aos seus respectivos alvos. Esta funcionalidade permitiu identificar a imunolocalização do antígeno alvo de cada clone de anticorpo na forma metacestódea de *T. solium*, demonstrando que reconhecem alvos diferentes, como detectado nas diferentes marcações de antígenos desta forma parasitária.

Na imunofluorescência quando se utilizou o clone B6 observou-se um padrão de marcação no tegumento. Nesta região existem células que secretam ativamente proteínas e outros componentes que posteriormente são transportados até o tegumento. Foram descritas a secreção de proteínas do citoesqueleto como miosina tipo II e actina (WILLMS, VARGAS-PARADA, LACLETE, 2006). O perfil de marcação reflete a localização do alvo para este anticorpo, como revelado pela espectrometria de massas onde a proteína mais abundante era justamente a actina. As diferentes seqüências de aminoácidos dos anticorpos podem estar relacionadas aos diferentes padrões de reatividade dos mesmos.

A falta de reatividade dos clones de anticorpos selecionados no teste WB utilizando o antígeno total levam a hipótese de que estes reconhecem epítomos conformacionais. Todos os anticorpos reagiram com epítomos nativos, alguns destes expressos no tegumento do cisticerco, como demonstrado pela imunofluorescência.

Após a verificação da funcionalidade dos clones e descoberta de seus antígenos verdadeiros, resolvemos aplicar estes fragmentos de anticorpos na captura de novos antígenos para aplicação no sorodiagnóstico. Partindo do pressuposto de que o elevado valor diagnóstico obtido em testes imunológicos utilizando frações antigênicas purificadas é fator preponderante na busca de antígenos para intensificarem as reações verdadeiramente positivas e minimizarem as reações cruzadas, foi realizado um processo de fracionamento do antígeno total, seguido de testes com as frações obtidas para escolha daquela com melhores parâmetros diagnósticos para posterior aplicação na captura de novos antígenos.

Considerando que a limitação da sorologia é a reatividade cruzada quando se utiliza extratos antigênicos totais, que são constituídos por diversos compostos protéicos compartilhados entre vários parasitas, foi realizado o passo de fracionamento em resina de troca iônica para se obter um antígeno mais específico.

A cromatografia de troca iônica, técnica baseada no intercâmbio de íons entre a resina e o analito, foi utilizada na purificação parcial de tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* (HÖLSCHER et al., 2003) e na purificação de tubulinas do nematódeo *Trichinella spiralis* (GONZÁLEZ; GONZÁLEZ; CAABEIRO, 1998). Todos os estudos acima utilizaram a resina dietilaminoetil celulose (DEAE). Os bons resultados obtidos com a fração DEAE S2 (que interagiu com os grupamentos catiônicos da resina) neste trabalho, com sensibilidade (90%), especificidade (93,3%) e AUC (0,981) revelaram o potencial desta fração para aplicação nos testes de captura.

Com base em argumentos de que altos níveis de purificação de antígenos podem estar relacionados com aumento da especificidade quando estes são aplicados em testes diagnósticos (CHENTHAMARAKSHA; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001), realizamos o fracionamento do antígeno total em resina de troca iônica e a melhor fração foi utilizada num segundo passo de fracionamento com a utilização dos anticorpos scFv. Após os testes realizados com as frações para detecção de IgG em amostras de soro, foi observado que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou as frações capturadas a partir do extrato salino total. Estes dados podem refletir a estratégia de seleção dos clones de anticorpos, que utilizou o extrato total ou antígenos relacionados a ele, uma vez que os peptídeos expostos em fagos utilizados como alvo de seleção são mimetópos deste extrato. Os altíssimos parâmetros diagnósticos no teste ELISA alcançados pelos antígenos capturados pelo clone A4 a partir do extrato total podem estar relacionados ao fato de este clone ter sido obtido através da seleção da biblioteca de anticorpos contra o próprio extrato total.

As análises das curvas ROC e TG-ROC levaram a obtenção do ponto ótimo de *cut-off* para cada fração antigênica capturada. As informações obtidas pelo teste ELISA mostraram um padrão diferencial na detecção de IgG para cada fração. A fração capturada pelo clone A4 a partir do extrato salino total exibiu aumento de sensibilidade e especificidade além dos maiores valores de AUC e LR. De acordo com Jaeschke; Guyatt; Sacket (1994), valores de likelihood ratio (LR) maiores que 10, praticamente confirmam o diagnóstico, o valor obtido pela fração capturada por A4 teve valor de LR igual a 60, demonstrando altíssimo desempenho para a detecção de IgG em pacientes com NC.

Nos testes ELISA, resultados falso-negativos observados nos pacientes do Grupo 1 podem ser associados a possíveis calcificações intra-parenquimatosas no SNC ou mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, uma vez que interações parasito-hospedeiro são de natureza complexa em função de antígenos parasitários em diferentes estágios evolutivos, variações genéticas individuais de cada paciente, número de cisticercos e suas diferentes

localizações. Todas estas variações podem contribuir para a diminuição da sensibilidade no diagnóstico da NC (MACHADO et al., 1996).

Além disso, os resultados falso-negativos podem também estar associados a casos assintomáticos da doença, uma vez que análises de protocolos de necropsias revelam pacientes com inúmeras calcificações e que, no entanto nunca relataram sintomas característicos para NC (REY, 2001). Zini; Farrel; Wadee, (1990) sugeriram ainda que resultados falso-negativos podem ocorrer em casos onde a doença parenquimal está presente, sugerindo tolerância imunológica ao parasito ou uma baixa produção de anticorpos.

A positividade observada entre algumas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2), possivelmente ocorreu devido à reações cruzadas devido a exposição antigênica ou infecções passadas, conforme demonstrado por vários autores (ZINI; FARREL; WADEE, 1990; GARCIA et al., 1998; GARCIA et al., 2003a; ISHIDA et al., 2003; PARIJA, et al., 2004).

Quando se avaliou o WB utilizando as frações capturadas na detecção de IgG em *pool* de amostras de soro de pacientes com NC, detectamos diferenças mínimas no perfil de proteínas reconhecidas pelos clones, foram observados dois perfis de reatividade, um referente às frações obtidas a partir da captura do antígeno total e outro referente àquela realizada na fração DEAE S2.

O fato de as frações capturadas a partir do extrato salino total terem apresentado maiores parâmetros diagnósticos (sensibilidade, especificidade, AUC e LR) pode estar relacionado à expressão da banda com uma faixa entre 50 a 70 kDa (mais precisamente 54kDa) uma vez que a proteína GP 50 está associada com o diagnóstico da cisticercose e tem sido utilizada nos últimos 15 anos nesta área (HANCOCK et al., 2004; FERRER et al., 2007). Embora as frações capturadas a partir da DEAE S2 tenham reconhecido a mesma banda os parâmetros diagnósticos alcançados foram menores, talvez este fato esteja relacionado ao reconhecimento de bandas com peso molecular acima de 70 kDa, muito relacionadas à ocorrência de reatividade cruzada no diagnóstico da NC.

Neste estudo, para o Grupo I houve reconhecimento das bandas: 35, 54, 100 e 120 kDa, algumas mantendo o reconhecimento de importantes marcadores da NC humana, como as bandas de 50 a 70 kDa, que são muito importantes no diagnóstico da NC, mostrando altos níveis de sensibilidade e especificidade (HANCOCK et al. 2004; BUENO et al. 2005).

Os antígenos das formas metacestódeas são misturas complexas de macromoléculas, com vários epítomos capazes de estimular anticorpos. A complexidade do antígeno total utilizado na captura de antígenos pode ser o fator responsável pela diferença entre o alvo para

cada clone detectado pela espectrometria de massas e o perfil de bandas observado do WB utilizando amostras de soro. As IgGs são reconhecidas corretamente, embora seus epítomos sejam diferentes conforme demonstrado pelos dados espectrometria de massas e ensaios de imunofluorescência.

Comparado aos resultados de outros autores utilizando antígenos sintéticos ou recombinantes, as frações capturadas pelos clones de anticorpos selecionados neste estudo alcançaram valores de sensibilidade e especificidade similares ou superiores. Atenção especial deve ser dada à análise estatística completa que revelou os altíssimos parâmetros diagnósticos alcançados pelas frações capturadas pelos clones de anticorpos, principalmente quando se considera as frações obtidas a partir do extrato salino total.

O estudo de Handali et al. (2009) encontrou sensibilidade e especificidade de 97% e 99,4%, respectivamente. Lee et al. (2011), utilizando os antígenos sintéticos ou recombinantes: T24H QuickELISA™, GP50 QuickELISA™, e Ts18var1 QuickELISA™ encontraram os seguintes valores de sensibilidade e especificidade: 96,3% e 99,2%; 93,5% e 98,6% e; 89,8% e 96,4%, respectivamente. Outro estudo realizado por Carod et al., (2012) avaliou 5 kits para ELISA comerciais para detecção de anticorpos contra *Taenia solium* em soro humano para diagnóstico da NC: DRG™, RIDASCREEN™, NOVATECH™, CYPRESS™, and IVD™, e verificou para todos os testes sensibilidades abaixo de 72% e especificidade acima de 60%.

Assim, fragmentos de anticorpos scFv específicos à antígenos de *T. solium* foram selecionados com sucesso, pela primeira vez, e se mostraram um ferramenta poderosa para o isolamento de antígenos relevantes, mais especificamente epítomos com grande potencial diagnóstico.

6 – CONCLUSÕES

Esta é a primeira demonstração de anticorpos scFv selecionados contra fagos recombinantes reativos contra soros positivos para NC e contra frações da forma metacestodea de *T. solium* por *Phage display*. O sucesso das seleções que resultaram em três fragmentos de anticorpos recobinantes contra peptídeos específicos foi demonstrado pelas altas sensibilidades e especificidades encontradas para os antígenos verdadeiros capturados pelos mesmos e comprovados por diversos imunoenaios.

A tecnologia de exposição de anticorpos em fagos filamentosos selecionados por *Phage Display* é sem dúvidas uma técnica de alto potencial para o estudo de interações antígeno-anticopo e para a descoberta de novos alvos diagnósticos e terapêuticos. Nossos resultados poderão permitir em futuro próximo uma melhor elucidação da biologia da interação na NC, além de possuir aplicação imediata no diagnóstico desta doença.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

AHMAD, Z.Z.; YEAP, S.K.; ALI, A.M.; HO, W.Y.; ALITHEEN, N.B.M.; HAMID, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012 *article in press*.

ALMEIDA, S.M.; TORRES, L.F. Neurocysticercosis--retrospective study of autopsy reports, a 17-year experience. **Journal of Community Health**, v.36, p.698-702, 2011.

ALVAREZ, J.I.; RIVERA, J.; TEALE, J.M. Differential release and phagocytosis of tegument glycoconjugates in neurocysticercosis: implications for immune evasion strategies. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.2, n.4, p.1-12, 2008.

ANTONIUK, S. Epidemiología de la neurocisticercosis. **Revista de Neurologia**, São Paulo, v.29, p.331-333, 1999.

ARRUDA, G.C.; DA SILVA, A.D.; QUAGLIATO, E.M.; MARETTI, M.A.; ROSSI, C.L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.10, p.1005-1012, 2005.

ATLURI, V.S.; SINGHI, P.D.; KHANDELWAL, N.; MALLA, N. 2D-PAGE analysis of *Taenia solium* metacestode 10-30 kDa antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis in children. **Acta Tropica**, v.118, p.165-169, 2011.

AZZAY, H.M.E.; HIGHSMITH, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v.35, p. 425-445, 2002.

BAERMANN, G. T. Eine einfache methode zur auffindung von anksylostomun (Nematoden) larven in erdproben. Mededeel. Mit H.in.Geneesk. Batavia, **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p.41-47, 1917.

BAIG, S.; DAMIAN, R.T.; MORALES-MONTOR, J.; GHALEB, A.; BAGHDADI, A.; WHITE, A.C. JR. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. **Microbes and Infection**, v.8, p. 2733- 2735, 2006.

BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAM, G.J. **Phage display. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7, 2001.

BENEDETTI, M.R.; FALAVIGNA, D.L.M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com neurocisticercose atendidos no hospital universitário regional de Maringá, Paraná, Brasil, **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.65, p.124-129, 2007.

¹ SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses. 4ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 163p.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.19, p. 1-33, 2001.

BENNETT, N.J.; RAKONJAC, J. Unlocking of the filamentous bacteriophage virion during infection is mediated by the C domain of pIII. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, p. 266-273, 2006.

BIRD, R.E.; HARDMAN, K.D.; JACOBSEN, J.W.; JOHNSON, S.; KAUFMAN, B.M.; LEE, S.M.; LEE, T.; POPE, S.H.; RIORDAN, G.S.; WHITLOW, M. Single-chain antigen-binding proteins. **Science**, v. 242, p.426-432, 1988.

BOEKE, J.D.; MODEL, P. A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retains it in the membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 79, p. 5200-5204, 1982.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

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, p. 278–283, 2005.

BURNEO, J.G.; PLENER, I.; GARCIA, H.H. Neurocysticercosis and Epilepsy Research Network. Neurocysticercosis in a patient in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v.180, p.639-642, 2009.

CARABIN, H.; KRECEK, R.C.; COWAN, L.D.; MICHAEL, L.; FOYACA-SIBAT, H.; NASH, T.; WILLINGHAM, A.L. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, p. 906–916, 2006.

CARDENAS, G.; VALDEZ, R.; SAENZ, B.; BOTTASSO, O.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E.; ROMANO, M.C.; FLEURY, A. Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters. **International Journal for Parasitology**, v.42, p.171–176, 2012.

- CAROD, J.F.; RANDRIANARISON, M.; RAZAFIMAHEFA, J.; RAMAHEFARISOA, R.M.; RAKOTONDRAZAKA, M.; DEBRUYNE, M.; DAUTIGNY, M.; CAZAL, P.; ANDRIANTSEHENO, M.L.; CHARLES, E.R. Evaluation of the performance of 5 commercialized enzyme immunoassays for the detection of *Taenia solium* antibodies and for the diagnosis of neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.72, p. 85-89, 2012.
- CARPIO, A. Neurocysticercosis: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.2, p.751-762, 2002.
- CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W.A. Cysticercosis and epilepsy: A critical review. **Epilepsia**, v.39, p.1025-1040, 1988.
- CASTILLO, Y.; RODRIGUEZ, S.; GARCÍA, H.H.; BRANDT, J.; VAN HUL, A.; SILVA, M.; RODRIGUEZ-HIDALGO, R.; PORTOCARRERO, M.; MELENDEZ, D.P.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; DORNY, P and Cysticercosis Working Group in Perú. Urine antigen detection for the diagnosis of human neurocysticercosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p. 379-383, 2009.
- CHAVARRÍA, A.; FLEURY, A.; BOBES, R.; MORALES, J.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. A depressed peripheral cellular immune response is related with symptomatic neurocysticercosis. **Microbes and Infection**, v.8, p.1082–1089, 2006.
- CHAVARRÍA, A.; ROGER, B.; FRAGOSO, G.; TAPIA, G.; FLEURY, A.; DUMAS, M.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1109–1115, 2003.
- CHENTHAMARAKSHAN, V.; VADIVELU, J.; AND PUTHUCHEARY, S. D. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.39, p. 1-7, 2001.
- CORREA, D.; SANDOVAL, M.A.; HARRISON, L.J.; PARKHOUSE, R.M.; PLANCARTE, A.; MEZA-LUCAS, A.; FLISSER, A. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p. 814–816, 1989.
- COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 44, p. 15-31, 1986.
- COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M.; CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 6, p. 337-341, 1982.
- COSTA-CRUZ, J. M.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; MORAES, A. T.; GUIMARÃES, A. H. B.; SALOMÃO, E. C.; ALCÂNTARA, T. M. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, p. 227-232, 1995.

CROCKER, C.; REDELINGS, M.; REPORTER, R.; SORVILLO, F.; MASCOLA, L.; WILKINS, P. The impact of neurocysticercosis in California: a review of hospitalized cases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. e1480, 2012.

DECKERS, N.; DORNY, P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. **Trends in Parasitology**, v.26, p.137-144, 2010.

DEL BRUTTO, O.H. Neurocysticercosis. **Seminars in Neurology**, v.25, p.243- 251, 2005.

DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J.; ROMAN, G.C. **Neurocysticercosis. A clinical handbook**, 1998.

DEL BRUTTO, O.H.; WADIA, N.H.; DUMAS, M.; CRUZ, M.; TSANG, V.C.; SCHANTZ, P.M. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. **Journal of Neurological Sciences**, v.142, p.1-6, 1996.

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

DEL BRUTTO, O.H.; DEL BRUTTO, V.J. Calcified neurocysticercosis among patients with primary headache. **Cephalalgia**, v.32, p. 250-254, 2012.

DESPLANCQ, D; KING, D.J.; LAWSON, A.D.; MOUNTAIN, A. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumourbinding antibody B72.3. **Protein Engineering**, v. 7, p. 1027-33. 1994.

DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, p. 79-86, 2003.

DYBWAB, A.; LAMBIN, P.; SIOUD, M.; ZOUALI, M. Probing the specificity of human myeloma proteins with a random peptide phage library. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, p. 583-590, 2003.

ENDEMANN, H.; MODEL, P. Location of filamentous phage minor coat proteins in phage and in infected cells. **Journal of Molecular Biology**, v. 250, p. 496-506, 1995.

FERREIRA, A. P.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; SASAKI, A. T.; FERREIRA, W.; LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 39, p. 29-33, 1997.

FERRER, E.; BONAYD, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L.M.; DÁVILA, I.; MARÍA MILAGROS CORTÉZ, M.M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.152, p.90-100, 2007.

FLISSER, A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. **Progress in Clinical Parasitology**, v.4, p.77-116, 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.

FLISSER, A.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J. P. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. **Investigación y Ciencia**, p. 24-33, 2006.

FORLENZA, O. V.; VIEIRA-FILHO, A. H.; MACHADO, L.R.; NOBREGA, J. P.; BARROS, N. G. Depressive disorders associated with neurocysticercosis: prevalence and clinical correlations. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.56, p.45-52, 1998.

FRIEDMAN, R. D. Comparison of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrilamida gels. **Annals of Biochemistry**, v. 126, p. 346-349, 1982.

GARCIA, E.; SOTELO, J. A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**, v.238, p. 379-382, 1991.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 14, p. 97 -119, 2000.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO , O.H. Imaging finding in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v.87, p.71-78, 2003.

GARCIA, H.H.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S.M.; TSANG, V.C.W.; GILMAN, R.H. Cysticercosis Working Group in Peru. 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.; GONZALEZ, A. E.; EVANS, C. A.W.; GILMAN, R. H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, v. 361, p. 547-556, 2003a.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GAVIDIA, C.; FALCON, N.; BERNAL, T.; VERASTEGUI, M.; RODRIGUEZ, S.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. Seroincidence of porcine *T. solium* infection in the Peruvian highlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, p. 227-236, 2003b.

GARCIA, H. H.; DEL BRUTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE, A. C.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, p. 3-9, 2005.

GNANASEKAR, M.; ANANDHARAMAN, V.; ANAND, S.B.; NUTMAN, T.B.; RAMASWAMY, K. A novel small heat shock protein 12.6 (HSP12.6) from *Brugia malayi* functions as a human IL-10 receptor binding protein. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.159, p. 98-103, 2008.

GOBBI, H.; ADAD, S.J.; NEVES, R.R.; ALMEIDDA, H.O. Ocorrência de cisticercose (*Cysticercus cellulosae*) em pacientes necropsiados em Uberaba. **Revista de Patologia Tropical**, v. 9, p. 51-59, 1980.

GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70, p. 78-84, 2011.

GONZÁLEZ, J. M.; GONZÁLEZ, J. A.; CAABEIRO, F. R. Purification of *Trichinella spiralis* tubulin: comparison of several analytic procedures. **Veterinary Parasitology**, v.77, p. 115-121, 1998.

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

HAMED, S.A.; EL-METAAL, H.E. Unusual presentations of neurocysticercosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v.115, p.192-198, 2007.

HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; GREENE, R.M.; YUSHAK, M.L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, J.W.; LEVINE, M.Z.; TSANG, V.C.W. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.133, p.115-124, 2004.

HANDALI, S.; KLARMAN, M.; GASPARD, A.N.; NOH, J.; LEE, Y.M.; RODRIGUEZ, S.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.; WILKINS, P.P. A multi-antigen print immunoassay (MAPIA) for comparison of diagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. **Clinical Vaccine and Immunology**, v. 17, p.68-72, 2009.

HANDALI, S.; KLARMAN, M.; GASPARD, A.N.; DONG, X.F.; LABORDE, R.; NOH, J.; LEE, Y.M.; RODRIGUEZ, S.; GONZALEZ, A.E.; GARCIA, H.H.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.; WILKINS, P.P. Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans. **Clinical Vaccine and Immunology**, v. 17, p.631-637, 2010.

HANLEY, J. A.; MCNEIL, B. J. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. **Radiology**, v. 148, p. 839-843, 1983.

HAWK, M.W.; SHAHLAIE, K.; KIM, K.D.; THEIS, J.H. Neurocysticercosis: a review. **Surgical Neurology**, v. 63, p.123 – 132, 2005.

HOBERG, E.P. *Taenia* tapeworms: Their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, v. 4, p.859-866, 2002.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal of Public Health Tropical Medicine**, v.9, p.283-291, 1934.

HÖLSCHER, C.; HARTMANN, R.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A. Effects of the isolation methodology on protein profiles of blood trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v.126, p. 41-51, 2003.

HUSTON, J.S.; LEVINSON, D.; MUDGETT-HUNTER, M.; TAI, M.S.; NOVOTNY, J.; MARGOLIES, M.N.; RIDGE, R.J.; BRUCCOLERI, R.E.; HABERT, E.; CREA, R.; OPPERMAN, H. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.85, p.5879-5883, 1988.

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

ITO, A.; CRAIG, P.S. Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. **Trends in Parasitology**, v.19, p. 377–381, 2003.

JAESCHKE, R.; GUYATT, G. H.; SACKET, D. L. Users' guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **Journal of the American Medical Association**, v.271, p.703-707, 1994.

KANOBANA, K.; PRAET, N.; KABWE, C.; DORNY, P.; LUKANU, P.; MADINGA, J.; MITASHI, P.; VERWIJS, M.; LUTUMBA, P.; POLMAN, K. High prevalence of *Taenia solium* cysticercosis in a village community of Bas-Congo, Democratic Republic of Congo. **International Journal for Parasitology**, v.41, p. 1015–1018, 2011.

KRECEK, R.C.; MICHAEL, L.M.; SCHANTZ, P.M.; NTANJANA, L.; SMITH, M.F.; DORNY, P.; HARRISON, L.J.S.; GRIMM, F.; PRAET, N.; WILLINGHAM III, A.L. Prevalence of *Taenia solium* cysticercosis in swine from a community-based study in 21 villages of the Eastern Cape Province, South Africa. **Veterinary Parasitology**, v. 154, p. 38–47, 2008.

LANZILLOTTI, R.; COETZER, T.L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends in Parasitology**, v.24, p. 18-23, 2008.

LEE, Y.M.; HANDALI, S.; HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; KOVALENKO, V.A.; LEVIN, A.; RODRIGUEZ, S.; LIN, S.; SCHEEL, C.M.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; GARCIA, H.H.; TSANG, V.C.W. Serologic Diagnosis of Human *Taenia solium* Cysticercosis by Using Recombinant and Synthetic Antigens in QuickELISA™. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p.587-593, 2011.

LIMA, J. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; GARCIA, L. V.; LEITE, J. P. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 217, p. 31-35, 2004.

LÓPEZ, I.C.; BERMEJO, P.G.; ESPIGA, P.J.G.R.; TAPIA, D.Q. Parkinsonismo sensible a levodopa en neurocisticercosis, **Neurología**, v.23, p. 3-5, 2008.

- LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-155, 1919.
- MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA NETTO, A.; NÓBREGA, J.P.S. (Ed.). **Neuroinfecção 96**. São Paulo: HC/FMUSP-Clinica Neurológica, 1996, 324p.
- MACHADO, G.A.; SANTIAGO, F.M.; MINEO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.12, p. 1–8, 2007.
- MAFOJANE, N.A.; APPLETON, C.C.; KRECEK, R.C.; MICHAEL, L.M.; WILLINGHAM, A.L. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. **Acta Tropica**, v. 87, p. 25–33, 2003.
- MAHANTY, S.; GARCIA, H.H. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v.91, p. 172–184, 2010.
- MANHANI, M.N.; RIBEIRO, V.S.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, v.33, p. 322–329, 2011.
- MCCAFFERTY, J.; GRIFTHS, A.D.; WINTER, G.; CHISWELL, D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552–554, 1990.
- MENDES, E. C.; SILVA, S. S.; FONSECA, E. A. LA TERZA; SOUZA, H. R. R.; CARVALHO, R. W. Human neurocysticercosis in Baixada Fluminense, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, p. 1058-1062, 2005.
- MERSICH, C.; JUNGBAUER, A. Generation of bioactive peptides by biological libraries. **Journal of Chromatography B**, v. 861, p.160–170, 2008.
- MILLER, B.; GOLDBERG, M.A.; HEINER,D.; MYERS,A.; GOLDBERG A. A new immunologic test for CNS cysticercosis. **Neurology**, v. 34, p. 695-697, 1984.
- MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v. 64, p. 507-624, 1948.
- NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**, v.23, p. 169-178, 2001.
- NUNES, D.S.; RIBEIRO, V.S.; MANHANI, M.N.; COSTA-CRUZ, J.M. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p.259–264, 2010.
- OLIVEIRA, H.B.; MACHADO, G.A.; CABRAL, D.D.; COSTA-CRUZ, J.M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v.101, p.1007-1113, 2007.

OLIVEIRA, H.B.; MACHADO, G.A.; MINEO, J.R.; COSTA-CRUZ, J.M. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions without affinity to concanavalin A are an important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Clinical Vaccine and Immunology**, v.17, p. 638-644, 2010.

PARMLEY, S.F; SMITH, G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors - affinity purification of target genes. **Gene**, v.73, p. 305-318, 1988.

PARIJA, M.; BISWAS, R.; HARISH, B.N.; PARIJA, S.C. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v.92, p.253-260, 2004.

PHIZICKY, E.M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detections and analysis. **Microbiological Reviews**, v.1, p. 94-123, 1995.

PINTO, P. S. A.; ALMEIDA, L. P.; GERMANO, P. M. L.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, M. Cysticercosis occurrence and sanitary risks in groups of inspected and non-inspected swine in Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v. 57, n. 3-4, p. 129-133, 2002.

PRABHAKARAN, V. ; JAYARAMAN, T. ; RAJSHEKHAR, V.; OOMMEN, A. Neurocysticercosis, IgG immunoglobulins, and nitric oxide. **Parasitology Research**, v.106, p.1287-1291, 2010.

PRASAD, A.; PRASAD, K.N.; GUPTA, R.K.; PRADHAN, S.; JHA, S.; TRIPATHI, M. Identification of immuno dominant fractions of *Taenia solium* cyst fluid and its cytokine response. **Annals of Neurosciences**, v.13, p.109, 2006.

PRASAD, A.; PRASAD, K.N.; YADAV, A.; GUPTA, R.K.; PRADHAN, S.; JHA, S.; TRIPATHI, M.; HUSAIN, M. Lymphocyte transformation test: a new method for diagnosis of neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.61, p. 198-202, 2008.

PRASAD, A.; PRASAD, K.N.; GUPTA, R.; PRADHAN, S. Increased expression of ICAM-1 among symptomatic neurocysticercosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 206, p. 118–120, 2009.

PUSHKER, N.; BAJAJ, M. S.; BALASUBRAMANYA, R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. **Journal of Infection**, v. 51, p. 245-248, 2005.

RAKONJAC, J.; MODEL, P. The roles of pIII in filamentous phage assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, p.25-41, 1998.

RAKONJAC, J.; FENG, J.N.; MODEL, P. Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII. **Journal of Molecular Biology**, v.289, p.1253-1265, 1999.

RAKONJAC, J.; BENNETT, N.J.; SPAGNUOLO, J.; GAGIC, D.; RUSSEL, M. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. **Current Issues on Molecular Biology**, v. 13, p. 51-76, 2011.

RESTREPO, I.B.; ALVAREZ, J.I.; CASTANO, J.A.; ARIAS, L.F.; RESTREPO, M.; TRUJILLO, J.; COLEGIAL, C.H.; TEALE, J.M. Brain granuloma in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. **Infection and Immunity**, v. 69, p.4554–4560, 2001.

REY, L. Cisticercose humana. In: **Parasitologia e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 510-520, 2001.

RIBEIRO, V.S. **Identificação de peptídeos sintéticos ligantes à imunoglobulinas G de pacientes com neurocisticercose por phage display**. 2009, 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) –Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

RIBEIRO, V.S.; MANHANI, M.N.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L.R.; COSTA-CRUZ, J.M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v. 129, p. 94–99, 2010.

ROCHA, S.M.; SUZUKI, L.A.; SILVA, A.D.; ARRUDA, G.C.; ROSSI, C.L. A rapid latex agglutination test for the detection Of anti-cysticercus antibodies in cerebrospinal fluid(CSF). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, p.57-58, 2002.

RODRIGUES, V. JR.; DE-MELLO, F.A.; MAGALHÃES, E.P.; RIBEIRO, S.B.; MARQUEZ, J.O. Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1059-1063, 2000.

SÁENZ, B.; FLEURY, A.; CHAVARRÍA, A.; HERNÁNDEZ, M.; VARGAS-ROJAS, J.C.M.I.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. Neurocysticercosis: local and systemic immune-inflammatory features related to severity. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, p.73-80, 2012.

SALAZAR-ANTON, F.; TELLEZ, A.; LINDH, J. Evaluation of an immunodot blot technique for the detection of antibodies against *Taenia solium* larval antigens. **Parasitology Research**, 2012 *article in press*..

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

SCHANTZ, P.M.; MOORE, A.C.; MUNOZ, J.L.; HARTMAN, B.J.; SCHAEFER, J.A.; ARON, A.M.; PERSAUD, D.; SARTI, E.; WILSON, M.; FLISSER, A. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 692–695, 1992.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J.P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as major health problem of global dimensions. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1875-1890, 2000.

SCIUTTO, E.; CHAVARRIA, A.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LARRALDE, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury, **Parasite Immunology**, v.29, p. 621–636, 2007.

SERGEeva, A.; KOLONIN, M.G.; MOLLDREM, J.J.; PASQUALINI, R.; ARAP. W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1622-1654. 2006.

SHANMUGAM, A.; SURIANO, R.; GOSWAMI, N.; CHAUDHURI, D.; ASHOK, B.T.; RAJORIA, S.; GEORGE, A.L.; MITTELMAN, A.; TIWARI, R.K. Identification of peptide mimotopes of gp96 using single-chain antibody library. **Cell Stress and Chaperones**, v.16, p.225–234, 2011.

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; MACHADO, E.R.; ARANTES, S.C.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 229-231, 2002.

SINGHI, P. Neurocysticercosis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 4, p. 67-81, 2011.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

SOPELETE, M. C. Métodos de análise em estudos sobre diagnóstico. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação, 1 ed. Uberlândia: EDUFU. 2005, p. 215-238.

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

SOUSA, A.Q.; SA, H.L.; QUEIROZ, T.R.; HORTA, W.G.; PEARSON, R.D. Neurocysticercosis in Ceara State, northeastern Brazil: a review of 119 cases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.759-762, 1998.

TAKAYANAGUI, O.M. Neurocysticercosis. I. Clinical and laboratory course of 151 cases, **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.48, p. 1-10, 1990.

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

TAKAYANAGUI, O. M.; ODASHIMA, N. S. Clinical aspects of neurocysticercosis. **Parasitology International**, v.55, p. 111-115, 2006.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. Enzyme-linked immuno electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 50-59, 1989.

VAUGHAN, T.J.; WILLIAMS, A.J.; PRITCHARD, D.K.; OSBOURN, J.K.; POPE, A.R.; EARNSHAW, J.C.; MCCAFFERTY, J.; HODITS, R.A.; WILTON, J.; JOHNSON, K.S. Human Antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 309–314, 1996.

VERASTEGUI, M.; GILMAN, R.H.; ARANA, Y.; BARBER, D.; VELÁSQUEZ, J.; FARFÁN, M.; CHILE, N.; KOSEK, J.C.; KOSEK, M.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.; Cysticercosis Working Group in Peru. *Taenia solium* oncosphere adhesion to intestinal epithelial and Chinese hamster ovary cells in vitro. **Infection and Immunity**; v.75, p. 5158–66, 2007.

VERMA, A.; PRASAD, K.N.; SINGH, A.K.; NYATI, K.K.; GUPTA, R.K.; PALIWAL, V.K.J. Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p.175–178, 2010.

WALLIN, M.T.; PRETELL, E.J.; BUSTOS, J.A.; CABALLERO, M.; ALFARO, M.; KANE, R.; WILKEN, J.; SULLIVAN, C.; FRATTO, T.; GARCIA, H.H. Cognitive Changes and Quality of Life in Neurocysticercosis: A Longitudinal Study. **Plos Neglected Tropical diseases**. v. 6, e1493, 2012.

WANG, I.C.; FAN, P.C.; LU, S.C.; FAN, C.K.; SU, K.E. Suppression of host Th1-type granulomatous inflammation by *Taenia solium* metacestodes is related to down-regulation of osteopontin gene expression. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 239–248, 2008.

WEISSER, N.E.; HALL, C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 502–520, 2009.

WHITE, A.C. Jr. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 101–115, 1997.

WHITE, A.C. Jr. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v.51, p.187–206, 2000.

WILLMS, K.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, P., J. Biología del parásito. In: ALUJA, S., A.; CARRILLO-MEZO, R.; CHAVARRÍA, A.; ESCOBAR, A.; FLISSER, A.; FLEURY, A.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E.; SOTELO, J.; WILLMS, K.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, P., J. **Cisticercosis : guía para profesionales de la salud**, Biblioteca de la Salud, Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México D.F; 2006.

WINKLER, A.S.; WILLINGHAM, A.L.; SIKASUNGE, C.S.; SCHMUTZHARD, E. Epilepsy and neurocysticercosis in sub-Saharan Africa. **Wien Klin Wochenschr**, v.121, p. 3–12, 2009.

YEH, S.J.; WU, R.M. Neurocysticercosis presenting with epilepsia partialis continua: a clinicopathologic report and literature review. **Journal of Formosan Medical Association**, v. 107, p. 576–581, 2008.

ZINI, D.; FARREL, V.J.R.; WADEE, A.A. The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.53, p.656-661, 1990.