

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE METACESTÓDEOS DE *Taenia saginata*  
OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NO  
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA**

**DANIELA DA SILVA NUNES**

Uberlândia

Fevereiro | 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE METACESTÓDEOS DE *Taenia saginata*  
OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA NO  
IMUNODIAGNÓSTICO DA NEUROCISTICERCOSE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

**Daniela da Silva Nunes**

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

**Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior**  
Coorientador

Uberlândia  
Fevereiro I 2013

*"O que tem que ser, tem muita força".*

Guimarães Rosa

*"Concede-me, Senhor, a **serenidade** necessária  
para aceitar as coisas que não posso modificar, **coragem**  
para modificar aquelas que posso e **sabedoria** para  
distinguir umas das outras".*

Oração da serenidade

## **Dedicatória**

*Aos meus amados pais,*

Marleno Francisco Nunes e Iva Lúcia Pereira da Silva Nunes, por minha vida, pelo amor e confiança depositada. Meus exemplos de vida!

*À minha irmã,*

Juliana da Silva Nunes, por entender minha ausência.

*Ao meu amor,*

Ludiel Costa Justino, seu apoio me proporcionou força a cada dia.

*Minha eterna gratidão pelo incentivo, paciência e carinho. Valeu a pena a distância e as renúncias. Obrigado por fazerem parte desse sonho realizado! Amo vocês.*

## Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida e por me iluminar, me dando força para vencer todos os obstáculos.

À minha família, pelo incentivo que vocês sempre me deram.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, oportunidade e dedicação. Muito obrigado pela confiança ao longo desses cinco anos de Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses.

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior pela coorientação, disponibilidade e ideias compartilhadas. Muito obrigado pela parceria, a qual tornou este estudo possível.

Ao Ms. Henrique Tomaz Gonzaga, pela amizade, auxílio técnico e metodológico durante o estudo.

À Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, por avaliar a dissertação na banca de defesa. Seus ensinamentos e convívio foram essenciais nas etapas iniciais de minha vida profissional. Muito obrigado!

Aos Professores Dr. Cláudio Vieira da Silva, Dra. Denise Von Dolinger de Brito, Dra. Janaina Lobato e Dra. Heliana Batista de Oliveira, pela participação e sugestões nas bancas de qualificação e defesa.

A todos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses pelo trabalho em equipe, que torna possível nossas pesquisas.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, em especial à Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, Rô obrigado pela paciência e disponibilidade nunca negada.

À turma de mestrado pelo convívio e situações compartilhadas. Foi um grande amadurecimento profissional e pessoal.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pelos ensinamentos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela atenção e disponibilidade.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos que estiveram presentes de forma direta ou indireta no decorrer destes dois anos, por fazerem cada momento valer a pena, obrigado!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
1.1 Classificação e morfologia de <i>Taenia saginata</i> e <i>Taenia solium</i>	14
1.2 Aspectos biológicos	15
1.3 Epidemiologia do Complexo Teníase-Cisticercose	16
1.4 Aspectos Patogênicos, Interação Parasito-Hospedeiro e Resposta Imune	19
1.5 Diagnóstico da Neurocisticercose Humana	21
<b>2. OBJETIVOS</b>	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
3.1 Aspectos éticos	25
3.2 Caracterizações dos grupos de estudo	25
3.3 Obtenção das formas metacestóideas de <i>T. saginata</i>	27
3.4 Preparação do extrato salino de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	27
3.5 Cromatografia de troca iônica do extrato salino de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	28
3.6 Análise do perfil eletroforético das frações antigênicas	30
3.6.1 Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	30
3.7 Testes sorológicos	31
3.7.1 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i>	31
3.7.2 <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i>	32
3.8 Análise estatística	33
3.9 Normas de biossegurança	34
<b>4. RESULTADOS</b>	35
4.1 Frações antigênicas de metacestódeos de <i>T. saginata</i> obtidas por cromatografia de troca iônica	35
4.2 Análise do perfil eletroforético das frações antigênicas em SDS-PAGE 12%	36
4.3 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> por ELISA utilizando ES, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2	38
4.4 <i>Immunoblotting</i> para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> utilizando ES, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2	44
<b>5. DISCUSSÃO</b>	47
<b>6. CONCLUSÃO</b>	52
<b>REFERÊNCIAS</b>	53
<b>ANEXO</b>	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

- (a) – verdadeiro positivo  
(b) – falso positivo  
(c) – falso negativo  
(d) – verdadeiro negativo  
 $\mu\text{l}$  – microlitro  
 $\mu\text{m}$  – micrometro  
 $^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius  
1D – unidimensional  
AUC – *area under curve*, área sob a curva  
CEP/UFU – Comitê de Ética em Pesquisa/UFU  
CM – resina carboximetil-sepharose (trocadora catiônica)  
CMS1 – fração que não interagiu com a resina CM  
CMS2 – fração que interagiu com a resina CM, apresentando resíduos catiônicos  
*cut-off* – limiar de reatividade, ponto ótimo  
DAB – diaminobenzidina  
DEAE – resina dietilaminoetil-sepharose (trocadora aniônica)  
DEAES1 – fração que não interagiu com a resina DEAE  
DEAES2 – fração que interagiu com a resina DEAE, apresentando resíduos aniônicos  
DO – densidade ótica  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay*  
Es – especificidade  
ES – extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata*  
g – gravidade  
G1 – grupo com diagnóstico definitivo para Neurocisticercose  
G2 – grupo com outras infecções parasitárias  
G3 – grupo com indivíduos saudáveis  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  – peróxido de hidrogênio  
 $\text{H}_2\text{SO}_4$  – ácido sulfúrico  
HCl – ácido clorídrico  
ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas  
IE – índice ELISA  
Ig – imunoglobulina  
IgA – imunoglobulina A  
IgE – imunoglobulina E  
IgG – imunoglobulina G  
IgM – imunoglobulina M  
kDa – kiloDalton

kHz – kilohertz

LR – *likelihood ratio*, razão de verossimilhança

LR+ – *likelihood ratio*, razão de verossimilhança positiva

LR- – *likelihood ratio*, razão de verossimilhança negativa

M – molaridade

mA – miliamperagem

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

N – normalidade

NaCL – cloreto de sódio

NC – Neurocisticercose

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – nível de significância

PBS – tampão fosfato-salino

PBS-T – PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%

PBS-TM – PBS acrescido de leite desnatado

pH – potencial hidrogeniônico

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil

PM – padrão de peso molecular

RM – ressonância magnética

ROC – *receiver operating characteristic curve*

rpm – rotações por minuto

$r_s$  – Coeficiente de correlação de Spearman

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Se – sensibilidade

SNC – Sistema Nervoso Central

Sp – specificity

TA – temperatura ambiente

TC – tomografia computadorizada

TG-ROC – *two-graph receiver operating characteristic curve*

Th1 – linfócitos T *helper 1*

Th2 – linfócitos T *helper 2*

TLR4 – receptor *toll-like 4*

Tris – tris(hidroximetil) aminometano

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

v – volt

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) por cromatografia de troca iônica em resinas Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniônica, para obtenção das frações antigênicas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2.

**Figura 2.** Perfil eletroforético do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), e das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS1, DEAES1 e DEAES2), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).

**Figura 3.** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=45), outras infecções parasitárias (G2; n=50) e indivíduos saudáveis (G3; n=45), utilizando extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1).

**Figura 4.** Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).

**Figura 5.** Comparação das curvas ROC, utilizando o método de Hanley e McNeil (1983). Extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica: (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2) e área sob a curva (*area under curve*; AUC).

**Figura 6.** Correlação entre níveis de IgG anti-metacestódeos de *Taenia solium* para o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2), nos pacientes com NC (G1; n=45). Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1). Coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivo e negativo são indicados nos quadrantes correspondentes.

**Figura 7.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC ativa (A) e NC inativa (B), utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). PM - padrão de peso molecular (kDa).

**Figura 8.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com outras infecção parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis (G3), utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). Linhas 1, 2, 3, 4 e 5: pacientes com outras infecções parasitárias (*Taenia* sp., *Hymenolepis nana*, ancilostomídeo, *Ascaris lumbricoides* e *Schistosoma mansoni*). Linha 6: indivíduo saudável. PM - padrão de peso molecular (kDa).

## RESUMO

Neurocisticercose (NC) é uma comum infecção do sistema nervoso central em humanos, seu diagnóstico é estabelecido pela combinação de dados clínicos, de neuroimagem (tomografia computadorizada e ressonância magnética), dados imunológicos e epidemiológicos. Testes sorológicos como o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e *immunoblotting* na detecção de anticorpos específicos contra metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro ou líquor, podem ser uma ferramenta viável para o diagnóstico da NC. O uso de antígenos heterólogos de metacestódeos de *Taenia saginata* para o imunodiagnóstico da NC é importante, principalmente em lugares onde a obtenção de antígeno homólogo de metacestódeos de *T. solium* é difícil. O objetivo do estudo foi fracionar e caracterizar parcialmente frações obtidas a partir do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* (ES) através de cromatografia de troca iônica em resinas Carboximetil-sepharose (CM) e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE), como fonte de marcadores antigênicos aplicáveis no imunodiagnóstico da NC. Para detecção de anticorpos IgG pelos testes ELISA e *immunoblotting*, 140 amostras de soro foram analisadas: 45 de pacientes com NC (G1), 50 de pacientes com outras infecções parasitárias (G2) e 45 indivíduos saudáveis (G3). Sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (AUC) e *likelihood ratios* (LR) foram calculadas. As frações CMS2 e DEAES2 apresentaram altos parâmetros de diagnóstico (Se 88,8% e 93,4%; Es 93,7% e 92,6%; AUC: 0,965 e 0,987, LR+: 14,07 e 12,67; LR-: 0,11 e 0,07, respectivamente). Em conclusão as frações CMS2 e DEAES2 são importantes fontes de peptídeos específicos, com alta eficiência para diagnosticar a NC.

**Palavras-chave:** Neurocisticercose; metacestódeos de *Taenia saginata*; troca iônica; Diagnóstico.

## ABSTRACT

### **Antigenic fractions from *Taenia saginata* metacestode obtained by ion-exchange chromatography in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis**

Neurocysticercosis (NC), is common infection of the human central nervous system, diagnosis is established by the combined analysis of clinical data, neuroimaging (computerized tomography and magnetic resonance), immunological and epidemiological data. Serological tests as enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting to detect specific antibodies against metacestodes of *T. solium* in serum samples or cerebrospinal fluid may provide a viable tool for the diagnosis of NC. The use of heterologous antigen from *Taenia saginata* metacestodes for NC immunodiagnosis is important where the collection of *T. solium* metacestodes for the preparation of homologous antigen is difficult. The aim of this study was to fractionate and partially characterize fractions obtained from the total saline extract (SE) of *T. saginata* metacestodes after ion-exchange procedure in carboxymethyl sepharose (CM) and diethylaminoethyl sepharose (DEAE) resins, as a source of antigenic markers applicable in the immunodiagnosis of NC. For IgG detection by ELISA and Immunoblotting, 140 serum samples were analyzed: 45 from patients with NC (G1), 50 from patients with other parasitic infections (G2) and 45 from healthy individuals. Sensitivity (Se), specificity (Sp), area under curve (AUC) and likelihood ratios (LR) were calculated. CMS2 and DEAES2 fractions provided high diagnostic values (Se 88.8% and 93.4%; Sp 93.7% and 92.6%; AUC 0.965 and 0.987, LR+ 14.07 and 12.67; LR- 0.11 and 0.07, respectively). In conclusion CMS2 and DEAES2 fractions are important sources of specific peptides, with high efficiency to diagnose NC.

**Keywords:** Neurocysticercosis; *Taenia saginata* metacestodes; Ion-exchange; Diagnosis.

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo teníase-cisticercose em humanos engloba duas doenças distintas, com sintomatologia diferentes: a teníase e a cisticercose. A urbanização desordenada, vigilância sanitária deficiente, ausência de saneamento básico e educação sanitária são os principais fatores que potencializam esse complexo. Essa zoonose incide em países subdesenvolvidos, principalmente os da Ásia, África e América Latina (FLISSER et al., 2003; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003; MEDINA et al., 2005; DEL BRUTTO, 2012a), sendo emergente em países desenvolvidos devido à migração de áreas endêmicas: 90% dos pacientes diagnosticados com neurocisticercose (NC) nos EUA e na Europa são imigrantes latino-americanos (DEL BRUTTO, 2012b). No Brasil, a ocorrência da NC é frequente nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, isso se deve a falta de diagnóstico específico e de baixo custo (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; AGAPEJEV, 2003; NASH, GARCIA, 2011; DEL BRUTTO, 2012a).

A NC forma mais grave da cisticercose é causada pela ingestão de ovos de *Taenia solium*. As manifestações clínicas da doença podem variar de assintomática a episódios graves (PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005; BRUNETTI; WHITE Jr, 2012). Em algumas regiões endêmicas, estudos de autopsias demonstraram uma frequência de 43,3% a 91% de indivíduos assintomáticos com NC (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). Existem poucos estudos em relação às estratégias de controle da NC, sendo necessário o aprimoramento de técnicas de diagnóstico para melhorar o controle da doença por razões econômicas e médicas (PAWLOWSKI, 2008).

### **1.1 Classificação e morfologia de *Taenia saginata* e *Taenia solium***

Os tenídeos possuem corpos achatados dorso-ventralmente e divididos em escólex, colo e estróbilo. O estróbilo é formado por uma cadeia de segmentos e cada segmento constitui uma proglote. Pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestodea, Ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae (REY, 2001; HOBERG, 2002).

O estágio adulto tanto de *T. solium* quanto de *Taenia saginata* apresenta o corpo leitoso, com comprimento médio de 1,5 a 4 metros, para *T. solium*, podendo atingir até 8 metros em *T. saginata*. O escólex de *T. solium* é piriforme apresentando quatro ventosas e uma dupla coroa de acúleos, com número variando entre 25 a 50, inseridas em um rostro situado entre as ventosas; *T. saginata* não possui rostro armado com acúleos (REY, 2001). O estróbilo corresponde ao restante do parasito e possui o aspecto de uma fita, sendo formado por vários segmentos, as proglotes, que se desenvolvem a partir do colo. As proglotes apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas.

As formas larvais ou metacestódeas, constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, com 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, apresentando no seu interior, líquido vesicular e escólex invaginado. A diferenciação da forma metacestódea entre as duas espécies é realizada pela observação do escólex. A forma metacestódea de *T. solium* possui rostro armado com acúleos e a forma metacestódea de *T. saginata* não possui rostro (SCIUTTO et al., 2000; REY, 2001).

Os ovos, de aproximadamente 30 a 45 µm de diâmetro, são esféricos e de aspecto radial quando observados à microscopia óptica, possuem envoltório denominado embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto, também denominado de oncosfera. Os ovos de *T. solium* e *T. saginata* são idênticos, sendo impossível diferenciar

quando examinados pelo microscópio óptico (SCIUTTO et al., 2000; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

## **1.2 Aspectos biológicos**

O único hospedeiro definitivo de *T. solium* e *T. saginata* é o homem. Os hospedeiros intermediários de *T. solium* são os suínos e os de *T. saginata* são os bovinos. Existem três fases com relação à população e parasitos: adulta no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e formas metacestódeas (fase larval) no hospedeiro intermediário (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

O homem ao ingerir carne crua ou mal cozida de suínos, bovinos ou suínos infectados respectivamente com formas metacestódeas viáveis de *T. solium* ou *T. saginata* desenvolverá a teníase (EOM; RIM, 1993). No tubo digestório do homem, por ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, as formas metacestódeas são liberadas das vesículas através de um processo de evaginação, alcançam a parede do intestino delgado e iniciam sua diferenciação em verme adulto (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006; YAMASAKI et al., 2006). As proglotes grávidas são eliminadas 60 a 70 dias após a ingestão da carne contaminada com os metacestódeos.

Na cisticercose humana, o hospedeiro intermediário accidental de *T. solium*, se infecta pela ingestão de ovos viáveis do parasito. Esse fato pode ocorrer de várias maneiras: (1) por meio da heteroinfecção, que consiste na manipulação direta de água ou alimentos contaminados com fezes humanas contendo ovos de *T. solium*, ou manipulação indireta através da irrigação e/ou fertilização com água e/ou esterco contaminados; (2) por meio da

auto-infecção externa, que consiste na ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio indivíduo portador da teníase sendo resultado de maus hábitos higiênicos (sobretudo a falta do hábito de lavar as mãos após a defecação); (3) por meio da auto-infecção interna, resultante de movimentos antiperistálticos ou de vômitos que permitem o retorno de algumas proglotes ao estômago para sofrer a ação do suco digestivo, o que permitirá a eclosão dos embriões infectantes (BARBOSA et al., 2000; REY, 2001; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003, HAWK et al., 2005). Além da auto-infecção interna, há relatos de meios alternativos de transmissão dos ovos de *T. solium* como coprofagia nos psicopatas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

A forma metacestódea pode se instalar praticamente em todos os órgãos do corpo humano, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, sistema nervoso central (SNC) e raramente a cavidade oral e medula espinhal (PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005; JAY et al., 2007; IZCI et al., 2008), sendo o SNC a localização mais importante, causando a forma mais grave e frequente que acomete grande número de pessoas, a NC (COSTA-CRUZ, 1995; BRUNETTI; WHITE Jr, 2012).

### **1.3 Epidemiologia do Complexo Teníase-Cisticercose**

A cisticercose humana é um grave problema de saúde pública em várias regiões da Ásia, África e América Latina, particularmente nos países em desenvolvimento, onde a precariedade das condições de saneamento básico e o baixo nível sócio econômico cultural favorecem sua disseminação (AGAPEJEV, 2003; COYLE et al., 2012).

Após encontro internacional sobre *T. solium* e o complexo teníase-cisticercose, com foco especial no leste e sul da África, realizado em Arusha, Tanzânia – África, em agosto de 2002, vários autores reafirmaram o problema de saúde pública da teníase-cisticercose na

América Latina, Ásia e África Central e Ocidental. Esta reunião ainda demonstrou que este parasito encontra-se difundido também na África Oriental e Meridional (DORNY et al., 2003; ZOLI et al., 2003). Em Papua na Indonésia, Ásia a prevalência de cisticercose varia entre 23,5 % e 56,9% (SALIM; ANG; HANDALI, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose atinge cerca de 50.000.000 indivíduos por ano, causando 50.000 mortes anualmente (PAL; CARPIO; SANDER, 2000).

A cisticercose é classificada como uma doença infecciosa emergente em países desenvolvidos, como no sudoeste da Ásia e Estados Unidos da América (CARPIO, 2002, NDIMUBANZI et al., 2010), devido à imigração de populações originárias de áreas endêmicas, principalmente para o estado da Califórnia (HAWK et al., 2005). Foram confirmados casos de cisticercose em Los Angeles, sendo a NC a forma mais comum (97,4%), embora tenha casos de cisticercose ocular e subcutânea (SORVILHO et al., 2011).

A NC é endêmica em países em desenvolvimento com alta taxa de imigração em países desenvolvidos (DEL BRUTTO, 2012b), é uma das causas mais comuns de epilepsia, 26,3% a 53,8% dos casos de epilepsia nos países em desenvolvimento, incluindo a Índia, China, sudeste da Ásia, América Latina, e África são devido a NC, que causa também convulsão e problemas neuropsicológicos (PRASAD et al., 2008; CARPIO; HAUSER, 2009; GUINTO; GUINTO, 2013). Em estudo realizado no sul da Índia, com indivíduos com crise convulsiva, 15,9% apresentaram reatividade para NC. Dentre esses indivíduos 17,7% eram da zona rural e 6% da zona urbana (PRABHAKARAN et al., 2008).

No continente americano a teníase e a cisticercose encontram-se prevalentes na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guatemala, México e Peru (ANTONIUK, 1999). No Peru a prevalência é de 0,5 a 1%, sendo mais freqüente em grávidas, jovens, e idosos (GARCIA et al., 2010).

No Brasil, embora o Ministério da Saúde recomende a implementação da notificação compulsória do complexo teníase-cisticercose, somente os Estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e a cidade Ribeirão Preto (SP) implantaram programas de controle (AGAPEJEV, 2003). 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, sendo o gênero feminino mais acometido (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; BRAGAZZA et al., 2002; AGAPEJEV, 2003; MENDES et al., 2005; BENEDETTI; FALAVIGNA; FALAVIGNA-GUILHERME 2007).

Na região Centro-Oeste, Oliveira et al. (2006), em um estudo soro-epidemiológico, demonstraram a endemicidade (11,3%) da cisticercose humana na cidade de Catalão – Goiás, localizada a 100 Km de Uberlândia. A região do Triângulo Mineiro constitui uma área de preocupação dentro do complexo teníase-cisticercose, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que se trata de uma região endêmica para este complexo (FERREIRA et al., 1994; COSTA-CRUZ, 1995; SILVA-VERGARA et al., 1998; ESTEVES; CARVALHO; SILVA-VERGARA, 2005; OLIVEIRA et al., 2006). Constatou-se a soroprevalência da cisticercose em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre (4,8%), e Uberlândia (4,7%) mostrando uma área problemática do Complexo Teníase-Cisticercose (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002).

O grande problema do Complexo Teníase-Cisticercose se deve ao fato dos portadores de teníase se auto-infectarem causando NC. Devido à dificuldade de tratamento de NC, busca-se a implantação de medidas de controle. No entanto, para estratégias de controle, indivíduos com NC não são alvos essenciais, pois não albergam o parasito adulto (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003). Para o controle da teníase e NC pode ser empregada uma intervenção através dos serviços médico e veterinário, usando uma quimioterapia foco-orientada da

teníase (PAWLOWSKI, 2008). Em estudo realizado no México durante o período de 1990 a 2009, a NC pode ser considerada não mais um problema de saúde pública, devido à educação sanitária (FLISSER; CORREA, 2010).

#### **1.4 Aspectos Patogênicos, Interação Parasito-Hospedeiro e Resposta Imune**

A patologia, clínica e resposta imunológica ao metacestódeo de *T. solium* estão relacionadas e dependem tanto da localização, do número, do tamanho e da fase de desenvolvimento em que se encontram os cisticercos, como da reação do hospedeiro nos tecidos parasitados (WHITE Jr, 2000; CARDENAS et al., 2012; DEL BRUTTO, 2012a).

Não existe uma sintomatologia própria ou um quadro único que diferencie a cisticercose de outras doenças, sendo assim é considerada uma doença polimorfa, com os mais diversos quadros clínicos. (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; SOTELO et al., 2011; ZYMBERG, 2012). Sintomas possíveis de NC incluem: náusea, vômito, cefaléia, ataxia, sinais neurológicos focais, hidrocefalia, vasculite, infarto cerebral e quadros neuropsiquiátricos diversos (FORLENZA et al., 1997; SAWHNEY et al., 1998; PAL; CARPIO; SANDER, 2000, RAMOS-ZÚÑIGA et al., 2013).

O cisticerco passa por vários estádios: 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; calcificado –

eventualmente o parasito é substituído por fibrose progressiva, que pode calcificá-lo (WHITE Jr, 2000).

Há um equilíbrio parasito – hospedeiro que é mantido como resultado da habilidade do parasito sobreviver no hospedeiro por longos períodos. A resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática, através da proliferação de linfócitos e posterior diferenciação em células efetoras tipo Th1 e Th2, com subsequente produção de várias citocinas, ou de células plasmáticas, com consequente produção de anticorpos específicos (CARPIO, 2002; SCIUTTO et al., 2007).

A resposta imune inata tem papel fundamental para a patogênese da NC, dependente de receptores *toll-like* 4 (TLR4). Foram identificados níveis de citocinas em associação com TLR4 em pacientes assintomáticos e sintomáticos, no entanto em pacientes sintomáticos os níveis de TLR4 correlacionados com a produção de citocinas pro-inflamatórias apresentaram níveis maiores (VERME et al., 2011).

Na resposta humoral destacam-se os anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, que são detectados tanto em amostras de soro quanto em amostras de líquor, além de serem encontrados em níveis superiores às demais classes de imunoglobulinas em diferentes amostras biológicas (SHORT et al., 1990; BUENO et al., 2000; PARDINI et al., 2002). Há elevação dos níveis de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgE, e IgA, respectivamente em ordem decrescente quanto aos níveis detectáveis. Os maiores valores são detectados em casos de cisticercose intraventricular e em casos de múltiplas manifestações (ODASHIMA; TAKAYANAGUI; FIGUEIREDO, 2002).

## 1.5 Diagnóstico da Neurocisticercose Humana

O diagnóstico da NC é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais, e neuroimagem (NASH, GARCIA, 2011; DEL BRUTTO, 2012a). O diagnóstico laboratorial compreende a pesquisa direta da forma metacestódea de *T. solium*, por meio de exames anatomo-patológicos após intervenção cirúrgica, biópsia ou necropsia. A neuroimagem compreende a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) que podem evidenciar o número e tamanho das lesões, a regressão da infecção e o nível da reação inflamatória do hospedeiro contra o parasito (PRETELL et al., 2005; GARG et al., 2008), sendo restrita em países subdesenvolvidos.

Novos conceitos no diagnóstico desta parasitose têm sido aperfeiçoados nos últimos anos; dentre os quais destaca-se a identificação e sequenciamento de抗ígenos específicos para se obter ensaios com alta sensibilidade e técnicas de fácil reproduzibilidade que não dependam do suprimento contínuo de parasitos para preparo antigenico (GARCIA et al., 2005; RIBEIRO et al., 2010; SILVA, COSTA-CRUZ, 2010; MANHANI et al., 2011). O imunodiagnóstico é um procedimento de baixo custo, sendo uma boa alternativa para o diagnóstico da NC, auxiliando a neuroimagem.

Entre os testes sorológicos mais utilizados para a detecção desta parasitose estão a imunofluorescência indireta, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Immunoblotting*. Dentre todos os métodos imunológicos o teste ELISA tem sido o ensaio mais estudado no diagnóstico da NC por apresentar significativa sensibilidade e especificidade, ser fácil e de simples execução, com baixo custo. Recomenda-se empregar dois testes imunológicos, sendo um de elevada sensibilidade e outro bastante específico, para maior segurança na interpretação dos resultados (COSTA-CRUZ, 1995; VAZ; LIVRAMENTO, 1996). A reação de

*Immunoblotting* e o teste ELISA apresentam diferenças quanto à sensibilidade e especificidade, porém a importância dos dois testes é salientada, principalmente nos casos em que os métodos diagnósticos de neuroimagens não são acessíveis (PRABHAKARAN et al., 2004).

O estudo de antígenos alternativos para o imunodiagnóstico da NC faz-se necessário para o conhecimento de casos isolados da doença em países não endêmicos e em regiões onde a coleta de metacestódeos de *T. solium* é difícil (FLEURY et al., 2003). Antígenos de metacestódeos de *Taenia crassiceps* substituem eficientemente os antígenos de parasitos suínos no imunodiagnóstico da NC (LARRALDE et al., 1989; VAZ et al., 1997). Barcelos et al. (2001) padronizaram o teste *immunoblotting* em 50 amostras de líquor utilizando extratos salino das formas metacestódeas de *T. solium* (homólogo) e *T. crassiceps* (heterólogo), foram reconhecidas quinze bandas de pesos moleculares aparentes, das quais onze já haviam sido descritas na literatura.

O extrato antigênico do líquido vesicular de *T. crassiceps* foi utilizado para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, no teste ELISA e *Immunoblotting* em amostras de soro e líquor. A sensibilidade e especificidade foram semelhantes ao antígeno homólogo, indicando que os cisticercos de *T. crassiceps* são fonte alternativa de antígenos no imunodiagnóstico da NC, por apresentar epítópos semelhantes ao antígeno homólogo (BUENO et al., 1998).

Metacestódeos de *T. saginata* foram avaliados como antígeno alternativo no diagnóstico sorológico da NC humana. Foram utilizados os testes imunofluorescência indireta, ELISA e *Immunoblotting* que apresentaram sensibilidade de 85%, 95% e 95% e 75%, 80% e 85% utilizando como antígeno, respectivamente, metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata*. A especificidade dos três testes utilizando antígeno de metacestódeos de *T. solium*

e de *T. saginata* foi de 95%, 89% e 94% e 96%, 89% e 94%, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre os antígenos de metacestódeos das duas espécies, demonstrando que o metacestódeo de *T. saginata* pode ser utilizado como antígeno alternativo no diagnóstico da NC humana (OLIVEIRA et al., 2007). Metacestódeos de *T. saginata* podem ser mais facilmente obtidos em quantidades adequadas, devido aos hábitos alimentares de muitos países, incluindo o Brasil, que utilizam a carne bovina como principal fonte de proteínas.

Extratos antigênicos são misturas heterogêneas de proteínas, glicoproteínas e outros componentes, por isso a utilização de proteínas antigênicas purificadas por técnicas cromatográficas consistem uma importante ferramenta para que o diagnóstico da NC humana seja realizado, evitando a reatividade cruzada com outros parasitos. As principais vantagens dessas técnicas incluem produção rápida, fácil, de baixo custo e com alta eficiência.

O fracionamento com Triton X-114 (TX-114), selecionou a fração detergente obtida a partir de metacestódeos de *T. solium* e *T. saginata*. As frações detergentes foram sensíveis e específicas utilizando os testes ELISA e *Immunoblotting* (MACHADO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010). Com a técnica de fracionamento por cromatográfica de afinidade em coluna de concanavalina A e jacalina, as frações não ligante se mostraram específicas e sensíveis no diagnóstico da NC humana, a partir de metacestódeos de *T. saginata*. (NUNES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). A detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* e de antígenos circulantes do parasito em amostras de soro e líquor são utilizados para o imunodiagnóstico da NC, no entanto mais estudos que identifiquem proteínas específicas são necessários, para que seja realizado o controle da NC (COSTA, 1986; SCIUTTO et al., 2000; DORNY et al., 2003; DECKERS; DORNY, 2010; MICHELET et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Analisar diferentes frações antigênicas de metacestódeos de *T. saginata* no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana.

### Objetivos específicos

1. Produzir extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*;
2. Isolar componentes antigênicos de metacestódeos de *T. saginata* por cromatografia de troca iônica em resinas em resinas Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniónica;
3. Analisar o perfil eletroforético das frações antigênicas obtidas em géis de poliacrilamida unidimensional (1D);
4. Detectar anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro frente aos extratos antigênicos por ELISA;
5. Realizar *immunoblotting* em amostras de soro frente aos extratos antigênicos obtidos para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, diferenciando NC ativa de NC inativa.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, em colaboração com o Laboratório de Imunoquímica e Imunotecnologia, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior. As amostras de soro estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. A manutenção destes espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) sob o protocolo nº 041/2008.

As formas metacestódeos de *T. saginata* estavam disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. O presente projeto foi aprovado no (CEP/UFU) sob o protocolo nº 382/11.

#### **3.2 Caracterizações dos grupos de estudo**

Foram avaliadas 140 amostras de soro. Os indivíduos foram divididos em três grupos: **Grupo I** - 45 pacientes com diagnóstico definitivo para neurocisticercose; **Grupo II** - 50 pacientes com outras infecções parasitárias; **Grupo III** - 45 indivíduos saudáveis.

**Grupo I** - 45 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo para NC: (a) todos pacientes apresentavam pelo menos um tipo de manifestação clínica sugestiva de NC,

sem sinais de cisticercose em outros órgãos; (b) todos pacientes eram provenientes de área onde a cisticercose é endêmica; (c) todas amostras de soro e/ou líquor foram positivas no teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- metacestódeos de *T. solium*; (d) todos pacientes apresentam evidência do parasito comprovado através de neuroimagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética), classificados de acordo com Sotelo et al. (1985): 25 pacientes com NC ativa (metacestódeos viáveis ou em degeneração) e 20 pacientes com NC inativa (metacestódeos calcificados).

Todos pacientes apresentavam diagnóstico definitivo para NC: 25 pacientes (55,5%) com um critério absoluto e 20 pacientes (44,5%) com dois critérios maiores mais um menor ou um critério epidemiológico, de acordo com Del Brutto (2012c).

**Grupo II** - 50 amostras de soro de pacientes com outras infecções parasitárias. Ancilostomatídeos (n=5), *Ascaris lumbricoides* (n=6), *Enterobius vermicularis* (n=5), *Giardia lamblia* (n=4), *Hymenolepis nana* (n=5), *Schistosoma mansoni* (n=4), *Trichuris trichiura* (n=4), *Taenia* sp. (n=6), *Strongyloides stercoralis* (n=7). Coinfecção: ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (n=1), ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* (n=1), *Entamoeba histolytica* + *G. lamblia* (n=1) e *H. nana* + *E. vermicularis* (n=1). Todas as amostras de soro foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Ritchie (1948).

**Grupo III** - 45 amostras de soro controle de indivíduos saudáveis, negativos para parasitos intestinais em exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (1919). Estes indivíduos não apresentavam manifestações clínicas sugestivas de outras infecções.

### **3.3 Obtenção das formas metacestódeas de *T. saginata***

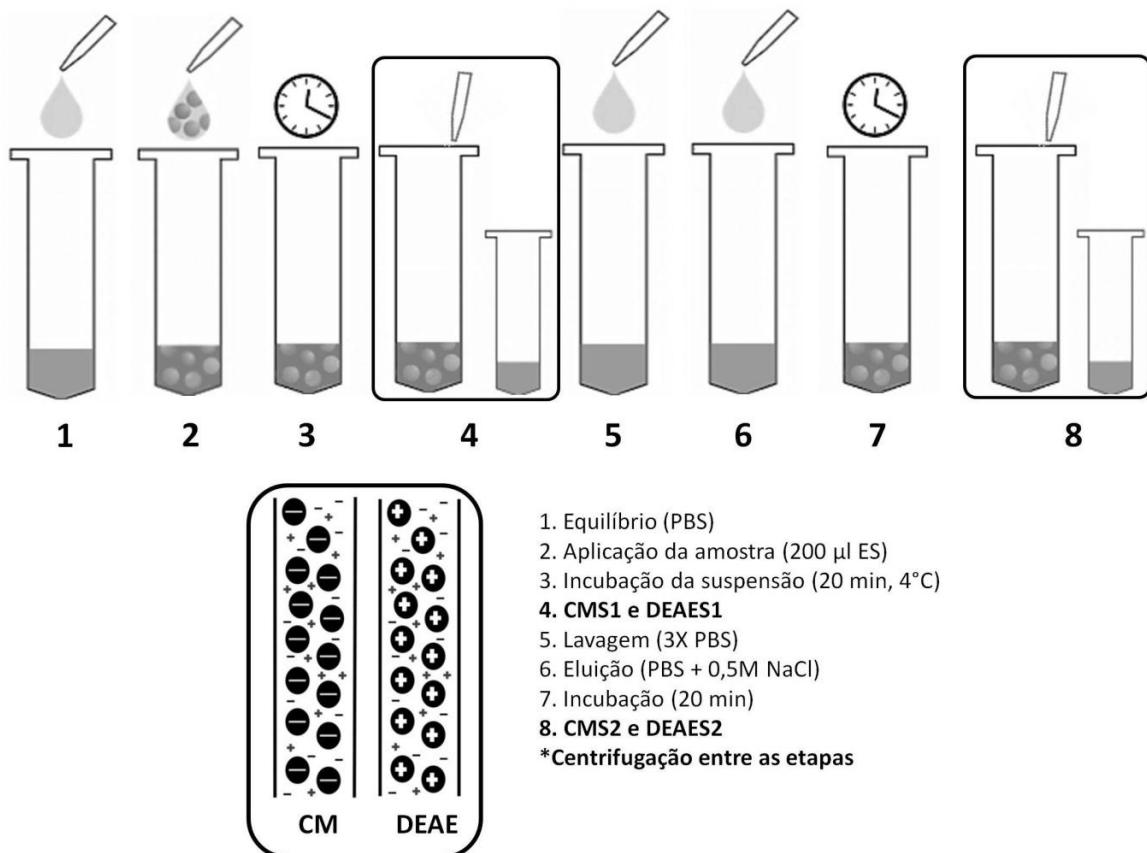
Os metacestódeos de *T. saginata*, provenientes da musculatura esquelética de bovinos naturalmente infectados, foram utilizados como fonte de antígeno para os testes imunológicos. Os parasitos foram separados por dissecação e lavados em solução salina (NaCl 0,15M) por quatro vezes, identificados e armazenados a -20°C.

### **3.4 Preparação do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata***

Foram utilizados 50 metacestódeos de *T. saginata*, de acordo com Costa (1986) com modificações. Os metacestódeos foram ressuspensos em 5 mL de água destilada contendo inibidores de proteases (ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM/L, benzamidina 1 mM/L, fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF) 1 mM/L, aprotinina 1 µg/mL e leupeptina 2 µg/mL), em seguida a mistura foi submetida a homogeneizador de tecidos, a 4°C por cinco ciclos de 1 minuto cada, em banho de gelo, e posterior tratamento com ultra-som a 40 KHz por quatro ciclo de 30 segundos cada em banho de gelo. Após isotonização com 5 mL de solução de NaCl (0,3 M), foram empregados mais três ciclos de ultra-som. Em seguida, a mistura foi incubada a 4°C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12400 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante obtido constituiu o extrato salino total. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

### **3.5 Cromatografia de troca iônica do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata***

O fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* foi realizado por cromatografia de troca iônica (**Figura 1**). Foram utilizadas as seguintes resinas: Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniónica (GE Healthsciences, EUA). O fracionamento foi realizado em microvolume em tubo de *eppendorf*. Resinas CM e DEAE foram equilibradas com 500 µl de tampão fosfato-salino (PBS). Foi aplicado 200 µl do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*, submetido à agitação horizontal por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes constituíram a 1<sup>a</sup> fração (CMS1 e DEAES1 - que não interagiu com a resina). Logo em seguida, as resinas foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,2 e eluídas com PBS pH 7,2 acrescido de cloreto de sódio (NaCl) 0,5M. Posteriormente foram submetidas à agitação horizontal por 20 minutos a 4°C e centrifugadas por 2 minutos em 2000 rpm. Os sobrenadantes constituíram a 2<sup>a</sup> fração (CMS2 e DEAES2 - que interagiu com a resina). Depois as resinas foram recuperadas com 3-5 ciclos de lavagem em tampão básico (carbonato-bicarbonato pH 9,6 – diluído 10 vezes em água destilada) seguido de tampão ácido (acetato de sódio pH 4,5). As resinas foram estocadas em etanol 20% e armazenadas a 4°C. Foi realizada a dosagem proteica das frações resultantes pelo método de Lowry et al., (1951).



**Figura 1.** Fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) por cromatografia de troca iônica em resinas Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniônica, para obtenção das frações antigênicas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2.

### **3.6 Análise do perfil eletroforético das frações antigênicas**

#### **3.6.1 Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% foi realizada para analisar o perfil proteico do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e das frações antigênicas (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2,). As amostras e o padrão de peso molecular foram submetidos à SDS-PAGE, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O gel foi preparado em suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical (Hoefer S300). Antes da aplicação no gel, o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e as frações foram diluídos em tampão de amostra 10x, e então submetidos a aquecimento por três minutos em banho-maria. As placas foram acopladas nas cubas contendo tampão de corrida tris-glicina. A migração dos polipeptídeos foi realizada em corrente de 20 mA e voltagem de 300V por aproximadamente uma hora. Padrão de peso molecular foi utilizado para o cálculo dos pesos moleculares relativos das bandas proteicas presentes nas amostras.

A coloração do gel foi feita com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982). O gel foi digitalizado em *scanner* para documentação. Os pesos moleculares das bandas foram estimados por regressão linear, de acordo com o padrão de peso molecular referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa, utilizando o programa computacional Kodak 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., EUA).

### 3.7 Testes sorológicos

#### 3.7.1 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*

As amostras foram avaliadas pelo teste ELISA para detecção de anticorpos IgG circulantes. Ensaios preliminares foram realizados para determinar condições ótimas para a reação ELISA através das diluições dos抗ígenos, do conjugado e das amostras de soro. Placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Interlab, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como suporte para a adsorção do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e das frações (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2,) em concentração de 5 µg/mL a um volume final de 50 µL/poço em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas três vezes, de cinco minutos cada, com PBS acrescido de Tween 20 (PBS-T) a 0,05%. As amostras de soro testadas na diluição 1/200 em PBS-T acrescido de 3% de leite desnatado (PBS-TM), foram acondicionadas (50 mL/poço) e incubadas por 45 minutos a 37 °C. Após novas lavagens com PBS-T, em três ciclos de cinco minutos, foi adicionado o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co, USA) na diluição 1/2000 (50 mL/poço). A reação foi incubada por 45 minutos a 37 °C. Após novos processos de lavagem a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD), preparado no momento de uso (0,005g de OPD + 12,5mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida, com a adição de 25µL de solução 2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (TITERTEK MULTISKAM PLUS, Flow Laboratories McLean, Vagua).

Para obtenção com precisão do ponto ótimo (*cut-off*), foi utilizado à análise pela curva *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC) (GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995). Os resultados da reatividade dos soros foram expressos em índice de ELISA (IE) – valores de absorbância dividido pelo *cut-off* para cada extrato antigênico. As amostras com IE >1 foram consideradas positivas.

### **3.7.2 *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium***

Os componentes proteicos do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e das frações antigênicas obtidas foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 1D e a seguir transferidos do gel para membranas de nitrocelulose, de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

Foi utilizado o sistema de eletrotransferência Semi-Seco (Bio-Rad, *Hercules*, California, USA) para acondicionar um *sandwich* com papel de filtro, membrana de nitrocelulose (0,20 µm, Bio-Rad) e gel. O *sandwich* foi umedecido em tampão de transferência (TRIS 25mM, glicina 192nM e metanol a 20%) e colocado na cuba de transferência (200 mA, 30 minutos). Ao término da transferência a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S a 0,5% em ácido acético a 1%, para confirmar as bandas eletrotransferidas. As membranas foram colocadas em cubas para *immunoblotting* e bloqueadas com PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (PBS-TM) por duas horas, a TA; depois foram lavadas com PBS-TM a 1%. As amostras de soro foram utilizadas na diluição 1/50 em PBS-TM a 1% para um volume final de 500 µL/poço e as membranas foram então incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Após as 18 horas as membranas foram submetidas a seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-T 1%, posteriormente adicionados 500µL

do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase na diluição 1/1500, em PBS-TM a 1%. Após duas horas sob agitação lenta a TA, as tiras foram submetidas a seis ciclos de lavagens com PBS. O teste foi revelado com *Fast-DAB* (Sigma-Aldrich, EUA) 3,3 diaminobenzidina (DAB) em PBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. Após a visualização das bandas antigênicas a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada.

O peso molecular de cada fração antigênica foi calculado de acordo com o padrão de peso molecular referência, a partir do cálculo da mobilidade relativa, utilizando o programa computacional Kodak 1D Image Analysis (Eastman Kodak Co., EUA).

### **3.8 Análise estatística**

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc.). As variáveis foram analisadas com os testes específicos, paramétricos ou não-paramétricos, segundo a distribuição dos dados. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Sensibilidade (Se) e especificidade (Es) foram calculados de acordo com Youden (1950), utilizando as seguintes fórmulas: Se (%) =  $[a / (a + c)] \times 100$  e Es (%) =  $[d / (b + d)] \times 100$ , onde: (a): verdadeiro positivo, (d): verdadeiro negativo, (b): falso positivo e (c): falso negativo.

Foram construídas curvas *receiver operating characteristic* (ROC) para descrever índices de eficácia diagnóstica (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003). Área sob a curva ou *area under curve* (AUC), foi calculada, onde: valores próximos a 1 indicam um teste informativo e valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; MCNEIL 1982). Foi realizada a comparação entre os extratos antigênicos utilizando o método descrito por Hanley e McNeil (1983), considerando  $p < 0,05$ . Razão de verossimilhança ou

*likelihood ratio* (LR), um eficiente parâmetro de diagnóstico, que indica o desempenho do teste, foi calculado.  $LR+ = Se/(1-Es)$ : indica a probabilidade de pacientes com NC ter um teste positivo comparado com pacientes negativos e  $LR- = (1-Se)/Es$ : indica a probabilidade de pacientes com NC ter um teste negativo comparado com pacientes negativos.

A correlação entre os extratos antigênicos foi determinada, pelo coeficiente de correlação de postos de Spearman ( $r_s$ ), que indica a relação linear entre duas variáveis. O coeficiente de correlação varia entre 0 e 1, valores próximos a 0 indicam que não há relação linear e valores próximos a 1 indicam que há relação linear entre os extratos antigênicos.

### **3.9 Normas de biossegurança**

Os procedimentos de colheita e manuseio dos materiais biológicos e reagentes, como também a utilização dos equipamentos, foram cumpridos de acordo com as normas de biossegurança descrita por Chaves-Borges e Mineo (1997).

## 4. RESULTADOS

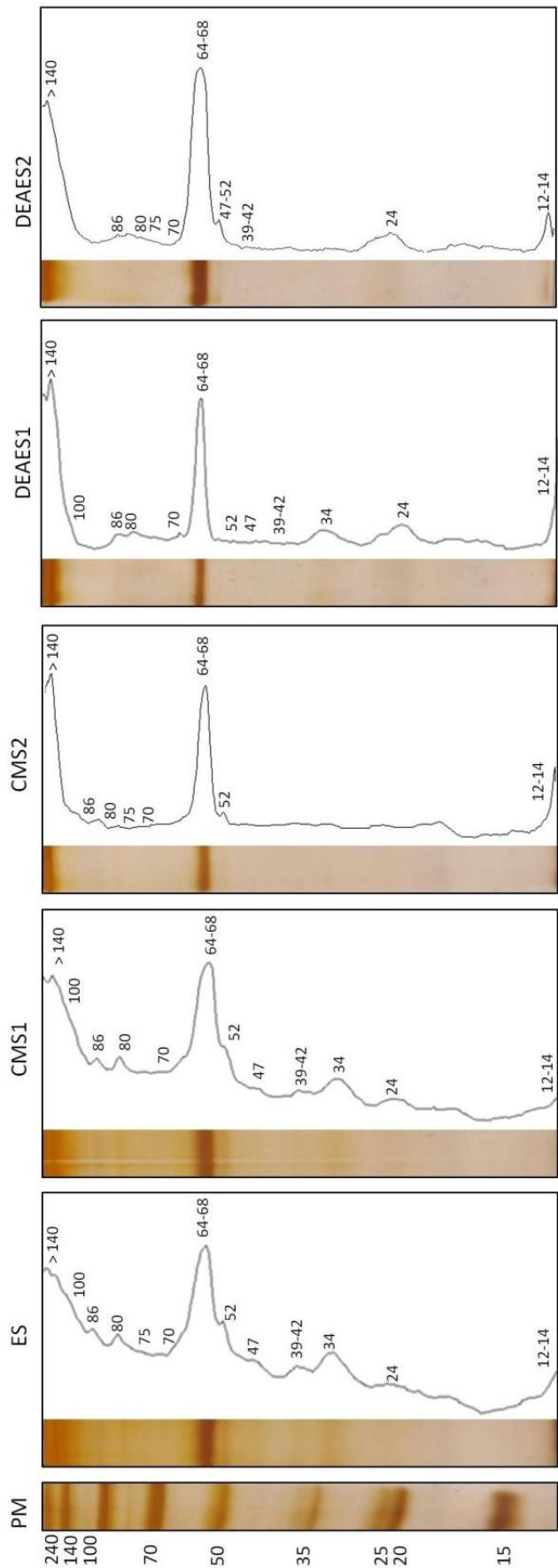
### 4.1 Frações antigênicas de metacestódeos de *T. saginata* obtidas por cromatografia de troca iônica

Cromatografia de troca iônica utilizando duas resinas: Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) (trocadora aniônica) e Carboximetil-sepharose (CM) (trocadora catiônica), foi realizada para fracionar o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*. Quatro frações distintas foram obtidas: CMS1 (não interagiu com a resina), CMS2 (interagiu com a resina, apresentando resíduos catiônicos), DEAES1 (não interagiu com a resina) e DEAE S2 (interagiu com a resina, apresentando resíduos aniônicos).

Cada fração apresentou um volume final de 200 µl. O extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* apresentava uma concentração proteica de 10.500 µg/mL. As frações antigênicas resultantes apresentaram as seguintes concentrações proteicas: CMS1: 4.340 µg/mL, CMS2: 870 µg/mL, DEAES1: 8.930 µg/mL e DEAES2: 1.884 µg/mL.

#### 4.2 Análise do perfil eletroforético das frações antigênicas em SDS-PAGE 12%

Foram analisados os perfis eletroforéticos do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* (ES) e suas frações antigênicas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2, depois de submetidos à SDS-PAGE 12% e corados por nitrato de prata (**Figura 2**). Os ES mostrou componentes proteicos, com massas moleculares variando entre <15 a 140 kDa. As frações CMS1 e CMS2; DEAES1 e DEAES2 tiveram um perfil eletroforético complementar. Nas frações CMS1 e DEAES1 foram observadas bandas com massas moleculares variando de 24 a 140 kDa, com intensidade de marcação diferenciada. A fração CMS2 apresentou uma porção enriquecida variando de 52 a 140 kDa. Todas as frações apresentaram um pico característico de bandas com massas moleculares de 64-68 kDa, na fração DEAES2 estas bandas apresentaram marcação com maior intensidade.



**Figura 2.** Perfil eletroforético do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), e das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).

#### 4.3 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* por ELISA utilizando ES, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2

Todas as amostras foram avaliadas pelo ELISA utilizando o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* (ES) e suas frações antigênicas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2, obtidas por fracionamento em resina de troca iônica (**Figura 3**). No Grupo 1, com NC, 88% (40/45) das amostras foram positivas para o ES, 86% (39/45) para CMS1, 88% (40/45) para CMS2 e 84% (38/45) para DEAES1. Quando o Grupo 1 foi testado com a fração DEAES2 a positividade foi alta: 93% (42/45). No Grupo 2, com outras infecções parasitárias, 20% (10/50) das amostras de soro foram positivas para o ES e 16% (8/50) para CMS1, 10% (5/50) para DEAES1 e DEAES2. A fração CMS2 apresentou baixa reatividade cruzada: 6% (8/50). No Grupo 3, com indivíduos saudáveis, a positividade foi baixa para os extratos antigênicos: 4% (2/45) para ES, CMS1, DEAES1, DEAES2 e 6% (3/45) para CMS2.

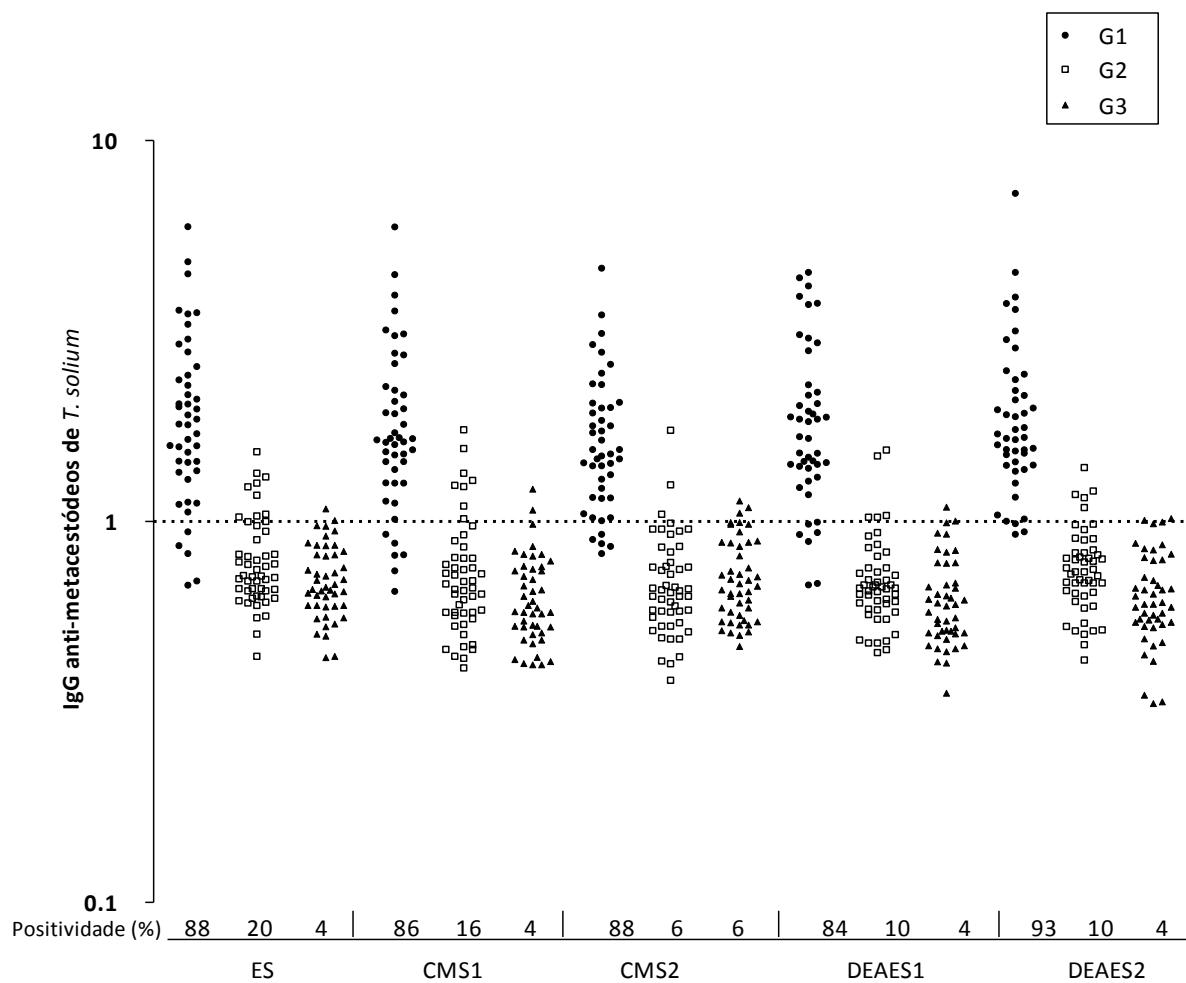
A reatividade cruzada apresentada no Grupo 2 ( $IR > 1$ ) foi observada quando testadas amostras de soro de pacientes infectados com: anquilostomídeos (1/5 ES, CMS1, CMS2, DEAE S1 e DEAES2), *S. mansoni* (2/4 ES, CMS1 e 1/4 DEAES1, DEAES2), *S. stercoralis* (2/7 ES e 1/7 CMS1), *A. lumbricoides* (1/6 ES, CMS2 e DEAES1) e *Taenia* sp. (1/6 ES, CMS1, DEAES1 e DEAES2). E em indivíduos com coinfecção: anquilostomídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (1/1 ES, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2), *E. histolytica* + *G. lamblia* (1/1 ES e CMS1) e *H. nana* + *E. vermicularis* (1/1 ES, CMS1 e DEAES2).

A curva ROC e a seleção de um ponto ótimo (*cut-off*) pela TG-ROC para cada extrato antigênico, estabeleceram os melhores parâmetros de sensibilidade e especificidade (**Figura 4**). Os resultados de sensibilidade e especificidade foram: 88,8% e 87,3% para ES, 86,6% e 89,4% para CMS1 e 84,4% e 92,6% para DEAES1, respectivamente. As frações CMS2 e

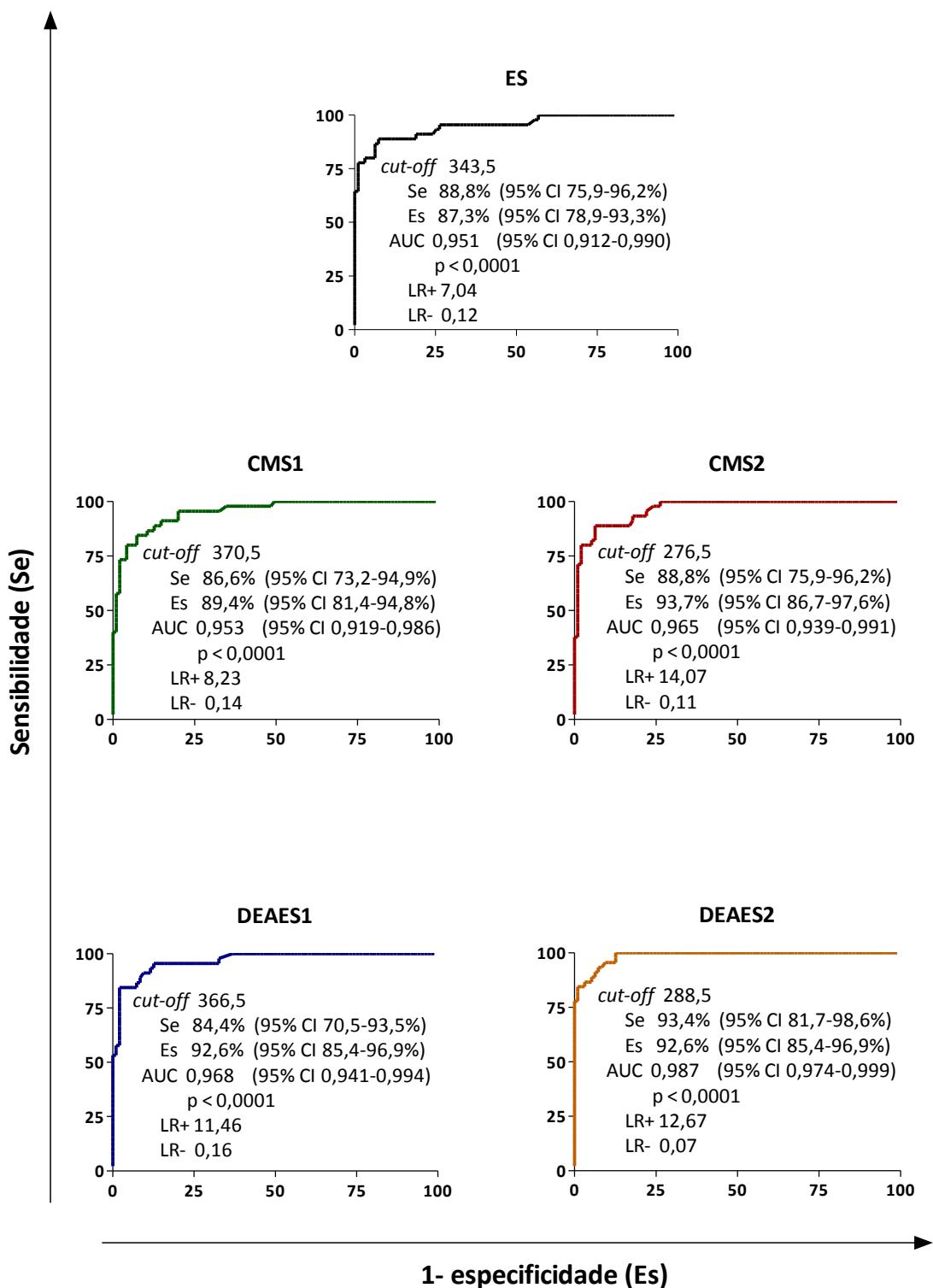
DEAES2 apresentaram a melhor performance diagnóstica com os seguintes valores de sensibilidade e especificidade, respectivamente: CMS2 (88,8% e 93,7%) e DEAES2 ( 93,4% e 92,6%).

Analizando o desempenho do teste, indicando pela área sob a curva (AUC), pelas curvas ROCs (**Figura 4**), a fração DEAES2 mostrou-se satisfatoriamente eficiente na detecção de anticorpos IgG de pacientes com NC (AUC: 0,987), diferenciando de pacientes com outras infecções parasitárias e indivíduos saudáveis. As outras frações apresentaram eficiência moderada, com valores de AUC: 0,953 para CMS1; 0,965 para CMS2 e 0,968 para DEAES1. O cálculo das *likelihood ratio* (LR), permite evidenciar a eficiência dos testes de diagnóstico. As frações CMS2 e DEAES2 indicaram ótimo desempenho diagnóstico: LR+: 14,07 e 12,67, respectivamente. De acordo com os valores das LRs-, a fração DEAES2 apresentou alta eficiência de eliminar que indivíduos positivos tenham um teste negativo: LR-: 0,07.

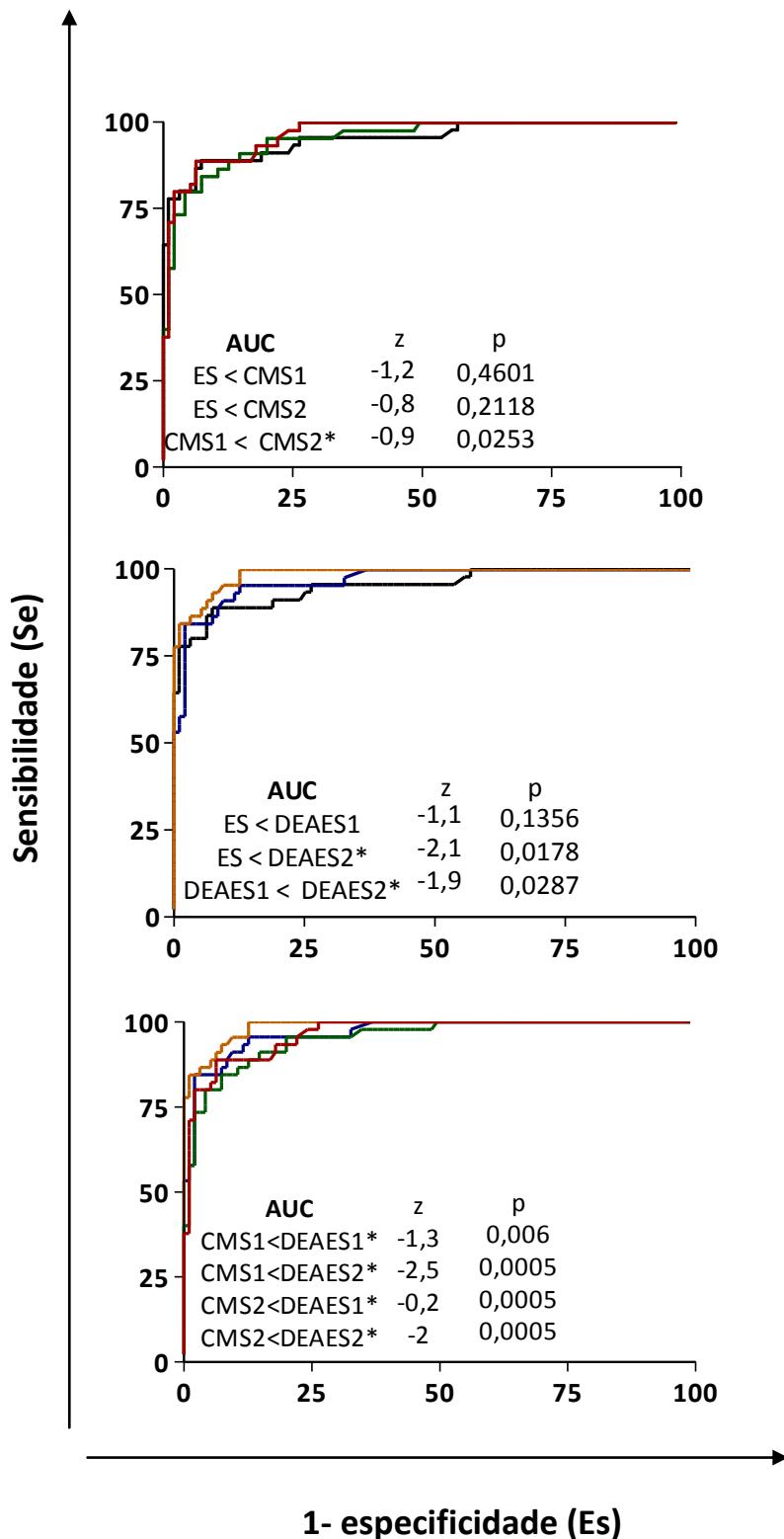
Comparando as curvas ROCs, pelo painel determinado por Hanley e McNeil (1983) (**Figura 5**), houve diferença estatística quando a comparação foi feita entre as frações ( $p<0,05$ ). Quando se comparou as frações com ES a fração DEAES2 foi significativamente melhor, no entanto mesmo não havendo diferença estatística entre ES e CMS2, esta fração apresentou bons parâmetros de diagnóstico. Correlações entre os níveis de IgG detectados pelas frações antigênicas foram realizadas no Grupo 1 (**Figura 6**). Pacientes com NC obtiveram uma correlação positiva entre ES e as frações analisadas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2, de acordo com o coeficiente não paramétrico de Spearman ( $r_s$ ) ( $p<0,0001$ ). DEAES2 apresentou 89% de pacientes duplo positivos e 6,6% duplo negativos, enquanto CMS2 apresentou 86,7% de pacientes duplo positivos e 8,9% duplo negativos, quando correlacionadas com ES.



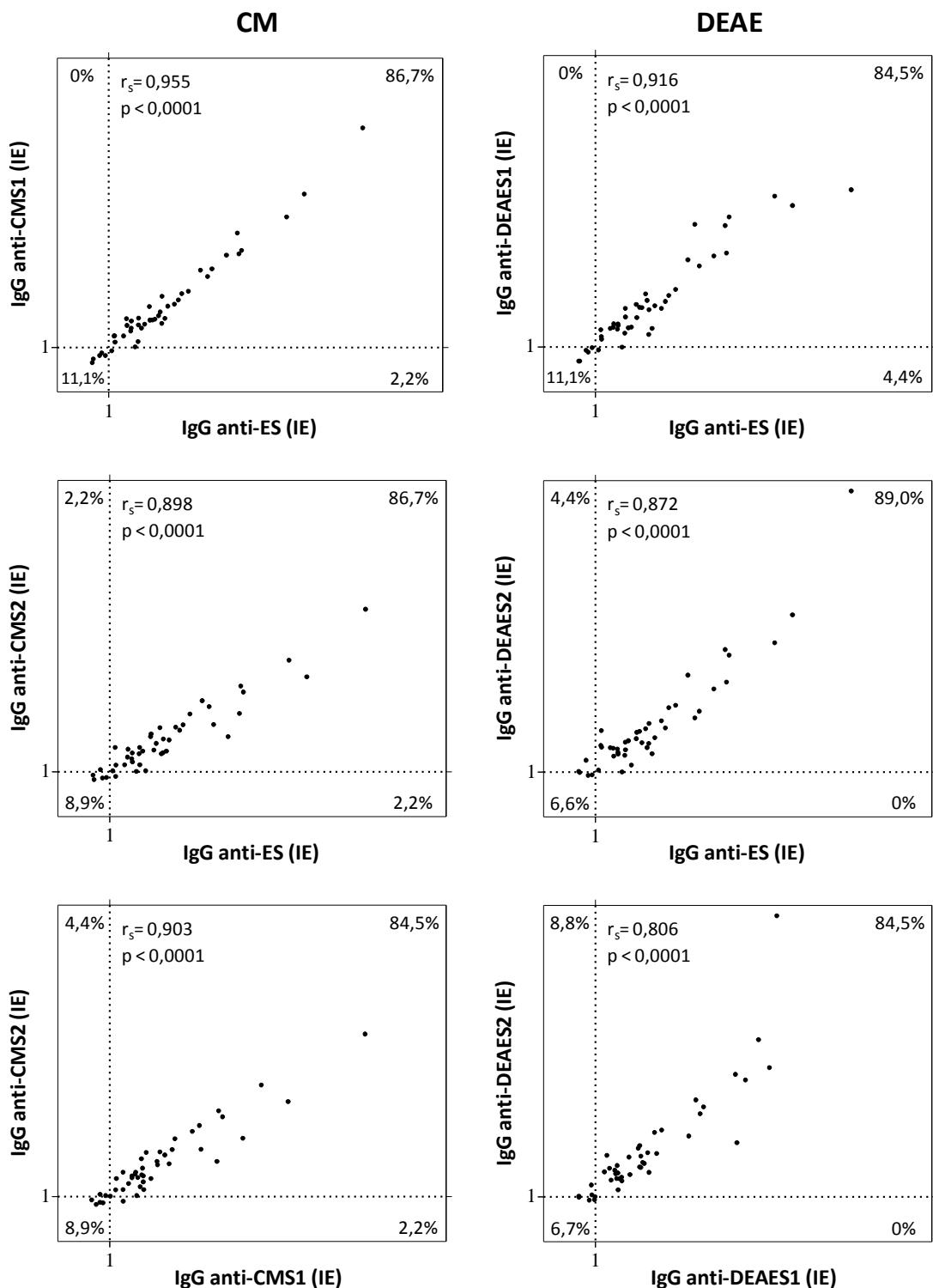
**Figura 3.** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=45), outras infecções parasitárias (G2; n=50) e indivíduos saudáveis (G3; n=45), utilizando extrato salino de metacostódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). Linha pontilhada indica o cut-off (Índice ELISA >1).



**Figura 4.** Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro utilizando o extrato salino de metacostódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).



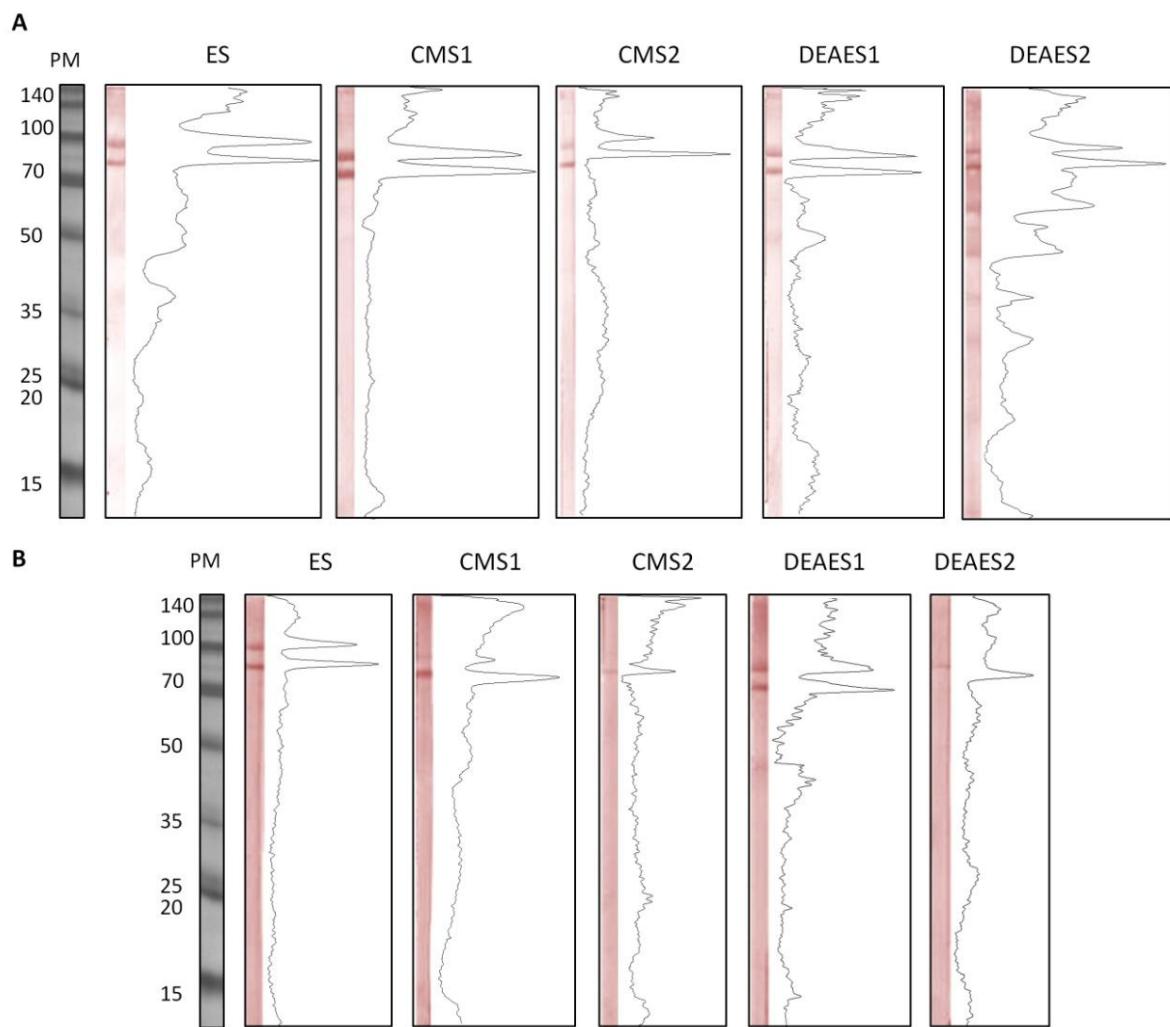
**Figura 5.** Comparação das curvas ROC, utilizando o método de Hanley e McNeil (1983). Extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica: (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2) e área sob a curva (area under curve; AUC).



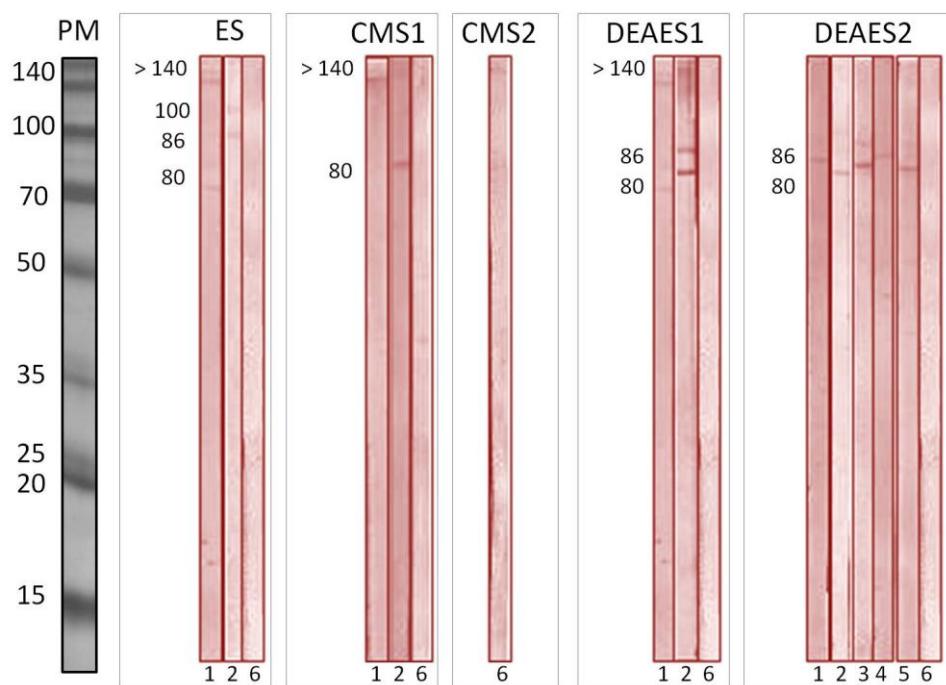
**Figura 6.** Correlação entre níveis de IgG anti-metacercódeos de *Taenia solium* para o extrato salino de metacercódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2), nos pacientes com NC (G1; n=45). Linha pontilhada indica o *cut-off* (índice ELISA >1). Coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Resultados positivo e negativo são indicados nos quadrantes correspondentes.

#### **4.4 *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* utilizando ES, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2**

O teste *Immunoblotting* foi realizado com todas as amostras de soro reativas no teste ELISA para ES e as frações antigênicas obtidas, para certificar a reatividade cruzada com o Grupo 2, todas amostras de soro foram testadas com as frações de interesse CMS2 e DEAES2. No Grupo 1, houve reconhecimento das proteínas imunodominantes com massa molecular (12-14, 24, 39-42, 47-52, 64-68, 70, 75, 80, 86, 100 e >140 kDa) para ES. Proteínas de alto peso molecular ( $\geq 80$  kDa) foram eliminadas do diagnóstico de acordo com Barcelos et al. (2007). Pacientes com NC ativa manifestaram alta frequência de proteínas com peso molecular de 39-42, 47-52 e 64-68 kDa quando utilizado a fração DEAES2 (**Figura 7A**). Pacientes com NC inativa manifestaram bandas de alto peso molecular quando utilizado o ES e as quatro frações antigênicas (**Figura 7B**). No Grupo 2 houve reconhecimento de bandas  $\geq 80$  kDa, quando utilizado ES, CMS1, DEAES1 e DEAES2. Não houve reconhecimento de bandas em amostras de soro de pacientes do Grupo 3 (**Figura 8**).



**Figura 7.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC ativa (A) e NC inativa (B), utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). PM - padrão de peso molecular (kDa).



**Figura 8.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com outras infecções parasitárias (G2) e indivíduos saudáveis (G3), utilizando o extrato salino de metacostódeos de *Taenia saginata* (ES) e as frações antigenicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2). Linhas 1, 2, 3, 4 e 5: pacientes com outras infecções parasitárias (*Taenia* sp., *Hymenolepis nana*, anelostomídeo, *Ascaris lumbricoides* e *Schistosoma mansoni*). Linha 6: indivíduo saudável. PM - padrão de peso molecular (kDa).

## 5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da NC baseia-se principalmente na neuroimagem, que nem sempre é acessível na maioria das áreas afetadas (GUINTO; GUINTO, 2013). O principal fator limitante com relação aos testes imunológicos trata-se da dificuldade de obtenção de metacestódeos de *T. solium*, principalmente em áreas não endêmicas (ISHIDA et al., 2003). De acordo com estudos realizado por Oliveira et al., (2009), o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* pode ser utilizado como antígeno alternativo para o imunodiagnóstico da NC.

Antígenos heterólogos no diagnóstico da NC humana, tanto em amostras de soro quanto de líquor, tem sido descrita com antígeno de *T. crassiceps* (LARRALDE et al., 1989; BARCELOS et al., 2001), no entanto a facilidade de obter metacestódeos de *T. saginata* em regiões não endêmicas, facilita a produção do antígeno heterólogo de metacestódeos de *T. saginata* (SAKO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007, 2009).

Um fator limitante no imunodiagnóstico da NC é a reatividade cruzada quando se utiliza extratos antigênicos totais. Sabe-se que os extratos antigênicos totais são constituídos por diversos compostos proteicos comuns entre vários parasitos. Desta forma, o fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* possibilita uma elevada eficiência diagnóstica, visto que limita as ligações inespecíficas com outros parasitos.

As altas sensibilidades e especificidades obtidas em testes imunológicos utilizando frações antigênicas purificadas são fatores determinantes para obter reações verdadeiramente positivas e que minimizem a reatividade cruzada com outros parasitos (GONÇALVES et al., 2010, NUNES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; GONZAGA et al., 2013).

Técnicas de fracionamento de extratos totais incluem o uso de ensaios cromatográficos. O fracionamento por cromatografia de troca iônica basea-se na separação de proteínas pela carga molecular, proteínas são ligadas às resinas por interações eletrostáticas. Essa técnica utiliza as resinas: Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniônica. O presente estudo foi o primeiro a utilizar a cromatografia de troca iônica para obtenção de frações antigênicas de metacestódeos de *T. saginata* potencialmente aplicáveis no imunodiagnóstico da NC. Essa técnica de fracionamento é uma ferramenta viável visto que é de baixo custo e fácil execução.

A caracterização parcial das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica por eletroforese unidimensional revelou um perfil de componentes complementares ao extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*. Foi observado bandas características de 64-68 kDa, importantes marcadores no diagnóstico da NC (OLIVEIRA et al., 2007). Houve uma região enriquecida de bandas específicas para o diagnóstico da NC (39-42, 47-52 e 64-68 kDa), quando utilizado a fração DEAES2, destacando sua alta sensibilidade nos testes imunológicos empregados.

A análise da curva TG-ROC para o teste ELISA possibilitou a obtenção de um ponto ótimo de corte para cada fração antigênica estudada, então um perfil diferencial na detecção de anticorpos IgG contra cada fração antigênica foi observado. Parâmetros diagnósticos foram observados, demonstrando que a frações CMS2 e DEAES2 apresentaram melhor performance diagnóstica: sensibilidade (88,8% e 93,7%), especificidade (93,4% e 92,6%), respectivamente.

De acordo com Jaeschke et al., (1994), valores de LR maiores de 10, confirmam o diagnóstico da doença, e valores abaixo de 0,1 excluem o diagnóstico da doença. A fração

DEAES2 apresentou ótimos valores: LR+: 12,67 e LR-: 0,07. Em paralelo a fração CMS2 apresentou valor excepcional da LR+: 14,07, destacando sua importância do diagnóstico da NC. A correlação encontrada nos pacientes com NC entre ES e DEAES2 para detecção de anticorpos IgG indicaram que esta fração contém抗ígenos envolvidos na resposta imune da NC, pois 89% dos pacientes com NC reagiram aos dois抗ígenos e 6,6% dos pacientes do Grupo 1, foram negativos aos dois抗ígenos. No entanto a fração antigênica CMS2, apresenta proteínas imunodominantes reconhecidas por pacientes com NC, uma vez que 86,7% dos pacientes apresentaram positividade, quando correlacionado ES e CMS2.

Utilizando frações antigênicas de metacestódeos de *T. saginata*, Oliveira et al., (2007) encontraram proteínas com peso molecular de 39-42 e 64-68 kDa, quando testadas com pacientes com NC ativa. Barcelos et al., (2007) identificaram os marcadores antigênicos: 47-52, 64-68 e 70, usando amostras de soro e/ou líquor de pacientes com NC ativa. A fração antigênica obtida por cromatografia de troca iônica de metacestódeos de *Taenia hydatigena* foi avaliada para o diagnóstico da cisticercose ovina, revelando a presença de proteínas de 68 kDa (PANDA; GHOSH; VARMA, 2000).

A fração DEAES2 apresentou alta frequência das proteínas: 39-42, 47-52 e 64-68 kDa, em pacientes com NC ativa, sugerindo que a fração DEAES2 é relevante no imunodiagnóstico da NC. No presente estudo amostras de soro de pacientes com NC inativa reconheceram bandas de 75 kDa, quando usado o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e as frações CMS2 e DEAES2, sugerindo um possível marcador antigênico para o diagnóstico da NC inativa.

Reatividade cruzada com bandas ( $\geq 80$  kDa) foi encontrada utilizando antígeno heterólogo de metacestódeos de *T. saginata* e/ou antígeno homólogo de metacestódeos de *T. solium* (BARCELOS et al., 2007). Esses dados evidenciam a menor especificidade da fração

DEAES2, comparada com a fração CMS2 uma vez que houve reatividade cruzada com componentes de alto peso molecular no Grupo 2, quando utilizado a fração DEAES2.

Resultados falso-positivos foram gerados com os seguintes parasitos: *Taenia* sp., *H. nana*, ancilostomídeos, *A. lumbricoides* e *S. mansoni*, em estudos anteriores esses parasitos foram os principais responsáveis pela reatividade cruzada na sorologia da NC, juntamente com *Echinococcus granulosus*, que não foi testado no presente estudo devido a falta de amostras de soro, já que a região não é endêmica para esta parasitose. Em contraste a fração CMS2 não apresentou reatividade cruzada com componentes do Grupo 2 sendo altamente específica, salientando sua importância no diagnóstico da NC. No Grupo 3 não houve reconhecimento de bandas, destacando a alta especificidade das frações CMS2 e DEAES2.

Para obter frações antigênicas mais purificadas e com elevado potencial no diagnóstico da NC, técnicas de fracionamento sequenciais, como a cromatografia de gel filtração em conjunto com a cromatografia de troca iônica, poderão ser utilizadas para fracionar o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*. Esse arranjo em série foi empregado para purificações de componentes metabólicos de outras espécies de parasitos (McGONIGLE; DALTON, 1995; AMLABU; NOK; SALLAU, 2009). Entretanto, foi pouco utilizado para purificações antigênicas com propósitos diagnósticos (REVILLA-NUÍN et al., 2005). Assim componentes de alto peso molecular serão excluídos, aumentando a especificidade das reações ELISA e *immunoblotting*, no diagnóstico da NC.

As vantagens do presente estudo se devem ao uso de frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica a partir do antígeno heterólogo de metacestódeos de *T. saginata*. As frações CMS2 e DEAES2 foram usadas pela primeira vez nos testes ELISA e *immunoblotting*, mostrando altos parâmetros diagnósticos e sugerindo a busca de

polipeptídios imunodominantes no diagnóstico da NC. Com o avanço da proteômica as frações CMS2 e DEAES2 poderão ser identificadas com discriminação de componentes sensíveis ou inespecíficos e ferramentas diagnósticas, vacinas ou terapêuticas poderão ser desenvolvidas.

## 6. CONCLUSÃO

As frações antigênicas CMS2 e DEAES2 obtidas a partir do fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* por cromatografia de troca iônica, em resinas Carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e Dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniónica são fonte de抗ígenos específicos para imunodiagnóstico da NC humana. Foi possível distinguir pacientes com NC ativa de NC inativa pelo *immunoblotting* revelando o reconhecimento específico das bandas 39-42; 47-52; 64-68 kDa (NC ativa) e 75 kDa (NC inativa).

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AGAPEJEV, S. Aspectos clínicos-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.61, p.822-828, 2003.

AMLABU, E.; NOK, A. J.; SALLAU, A. B. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. **Parasitology International**, v. 58, p. 238-243, 2009.

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

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffinding von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p.41-47, 1917.

BARBOSA, A. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, S. A.; CAMPOS, D. M. B. Cisticercose: fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro, diagnóstico e soroprevalência. **Revista de Patologia Tropical**, v.29, p.17-29, 2000.

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

---

<sup>1</sup> De acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em: SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FREITAS, N.E. **Guia para normatização de trabalhos técnicos-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses**. 4<sup>a</sup> ed. Uberlândia: EDUFU, 2002. 163p.

BARCELOS, I. S. C.; MOURA, L. P.; COSTA, V. P.; FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia solium* metacestodes immunodominant peptides recognized by IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum paired samples from patients with active and inactive neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 713-717, 2007.

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.

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.

BRUNETTI, E.; WHITE, A. C. Jr. Cestode infestations: hydatid disease and cysticercosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.26, p.421-435, 2012.

BUENO, E. C.; NAKAMURA, P. M.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; VAZ, A. J. Diagnóstico imunológico da neurocisticercose: Anticorpos IgG anti-*Taenia solium* (forma larvária) em líquido cefalorraquidiano e soro utilizando antígeno heterólogo. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.34, p.10, 1998.

BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. D.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v.58, p.18-24, 2000.

CARDENAS, G.; VALDEZ, R.; SÁENZ, 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.

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

CARPIO, A.; HAUSER, W. A. Epilepsy in the developing world. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.9, p.319-326, 2009.

CHAVES-BORGES, F. A.; MINEO, J. R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: EDUFU, 1997, 55p.

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 cefalorraquidiano. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.44, p.15-31, 1986.

COSTA-CRUZ, J. M. Diagnóstico imunológico da cisticercose. Anais XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia. **Sociedade Brasileira de Parasitologia**, p.105-106, 1995.

COYLE, C. M.; MAHANTY, S.; ZUNT, J. R.; WALLIN, M. T.; CANTEY, P. T.; WHITEJr, A. C.; O'NEAL, S. E.; SERPA, J. A.; SOUTHERN, P. M.; WILKINS, P.; MCCARTHY, A. E.; HIGGS, E. S.; NASH, T. E. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v.6, e:1500, 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: a review. **The Scientific World Journal**, 2012: 159821, 2012a.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis in Western Europe: a re-emerging disease? **Acta neurologica Belgica**, v. 12, p. 335-343, 2012b.

DEL BRUTTO, O. H. Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. **Pathogens and Global Health**, v. 106, p.299-304, 2012c.

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

EOM, K. S.; RIM, H. J. Morphological description of *Taenia asiatica* sp. **The Korean Journal of Parasitology**, v.31, p.1-6, 1993.

ESTEVES, F. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; SILVA-VERGARA, M. L. Inquérito epidemiológico sobre teníase em população do PSD no município de Uberaba, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, p.530-531, 2005.

FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M.; NISHIOKA, S. A.; MANTESE, O. C.; CASTRO, E.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MOURA, L. P. Neurocysticercosis in Brazilian children: report of 10 cases. **Tropical Medicine and Parasitology**, v.45, p.49-50, 1994.

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

FLISSER, A.; CORREA, D. Neurocysticercosis may no longer be a public health problem in Mexico. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, p.e831, 2010.

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*: um parasito cosmopolita. **Investigación Y Ciência**, v.356, p.24-33, 2006.

FORLENZA, O. V.; VIEIRA FILHO, A. G.; NÓBREGA, J. P. S.; MACHADO, L. R.; BARROS, N. G.; CAMARGO, C. H. P.; SILVA, M. F. G. Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v.62, p.612-616, 1997.

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

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

GARCIA, H. H.; DEL BRUTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE-JÚNIOR, 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.

GARCIA, H. H; GONZALEZ, A. E; RODRIGUEZ, S; GONZALVEZ, G; LLANOS-ZAVALAGA, F; TSANG, V.C.W. GILMAN, R. H. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.27, p.592-597, 2010.

GARG, R. K.; DESAI, P.; KAR, M.; KAR, A. M. Multiple ring enhancing brain lesions on computed tomography: an Indian perspective. **Journal of the Neurological Sciences**, v.266, p.92-96, 2008.

GONÇALVES, F. A; MACHADO, G. A; OLIVEIRA, H. B; REZENDE, M. T. N. P; MINEO, J.R; COSTA-CRUZ, J.M. Hydrophobic fraction of *Taenia saginata* metacestodes, rather than hydrophilic fraction, contains immunodominant markers for diagnosing human neurocysticercosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.254-259, 2010.

GONZAGA, H. T.; VILA-VERDE, C.; NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Ion-exchange protocol to obtain antigenic fractions with potential for serodiagnosis of strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 140, p. 69-75, 2013.

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.

GUINTO, G.; GUINTO, Y. Neurocysticercosis: Is Medical Management Innocuous? **World Neurosurgery**, v. 79, p. 71-72, 2013.

HANLEY, J. A.; MACNEIL, B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, v. 143, p. 29-36, 1982.

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.

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.

IZCI, Y.; MOFTAKHAR, R; SALAMAT, M. S; BASKAYA., M. K. Spinal intramedullary cysticercosis of the conus medullaris. **WMJ:official publication of the State Medical Society of Wisconsin**, v.107, p.34-39, 2008.

JAESCHKE, R.; GUYATT, G.H.; SACKET, D. L. Users' guides 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. **JAMA**, v. 271, p. 703-707, 1994.

JAY, A.; DHANDA, J.; CHIODINI, P. L.; WOODROW, C. J.; FARTHING, P. M.; EVANS, J.; JAGER, H. R. Oral cysticercosis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.45, p.331-334, 2007.

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

LARRALDE, C.; MONTOYA, R.M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M.L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.40, p.282-290, 1989.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.29, p.265-275, 1951.

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, 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.1369-1376, 2007.

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.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 11, p. 7-31, 2003.

McGONIGLE, S.; DALTON, J. P. Isolation of *Fasciola hepatica* haemoglobin. **Parasitology**, v. 111, p. 209-215, 1995.

MEDINA, M. T.; DURON, R. M.; MARTINEZ, L.; OSORIO, J. R.; ESTRADA, A. L.; ZUNIGA, C.; CARTAGENA, D.; COLLINS, J. S.; HOLDEN, K. R. Prevalence, incidence and etiology of epilepsies in rural Honduras: the Salama Study. **Epilepsia**, v.46, p.124-131, 2005.

MENDES, E. C.; SILVA, S. S.; FONSECA, E. A.; SOUZA, H. R.; CARVALHO, R. W. Human neurocysticercosis in Baixada Fluminense, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.63, p.1058-1062, 2005.

MICHELET, L.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E.; KENDJO, E.; FRAGOSO, G.; PARIS, L.; BOUTEILLE, B. Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. **Journal Clinical Microbiology**, v.49, p.195-200, 2011.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial em Saúde Pública**, v.64, p.507-624, 1948.

NASH, T. E.; GARCIA, H. H. Diagnosis and treatment of neurocysticercosis. **Nature Reviews. Neurology**, v.7, p.584-594, 2011.

NDIMUBANZI, P. C.; CARABIN, H.; BUDKE, C. M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y. J.; RAINWATER, E.; DICKEY, M.; REYNOLDS, S.; STONER, J. A. A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.4, p. e831, 2010.

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. 258-264, 2010.

ODASHIMA, N. S.; TAKAYANAGUI, O. M.; FIGUEIREDO, J. F. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. **Arquivos de Neuro- Psiquiatria**, v.60, p.400-405, 2002.

OLIVEIRA, H. B.; RODRIGUES, R. M.; BARCELOS, I. S. C.; SILVA, L. P.; COSTACRUZ, J. M. Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a Central-Western region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p. 49-52, 2006.

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.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MOURA, L. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Saline extract of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Parasitology Research**, v.105, p.169-174, 2009.

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 and Vaccine Immunology**, v. 17, p.638-644, 2010.

PAL, D. K.; CARPIO A.; SANDER J. W. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.68, p.137-143, 2000.

PANDA, M. R.; GHOSH, S.; VARMA, T. K. Potential diagnostic test for experimental and natural ovine *Taenia hydatigena* cysticercosis. **Acta Veterinaria Hungarica** v. 48, p. 173-182, 2000.

PARDINI, A. X.; PERALTA, R. H.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; PERALTA, J. M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, p.190-193, 2002.

PAWLOWSKI, Z. Control of neurocysticercosis by routine medical and veterinary services. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.228-232, 2008.

PAWLOWSKI, Z.; ALLAN J.; SARTI, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. **International Journal for Parasitology**, v.2, p.1-12, 2005.

PFUETZENREITER, M. R.; ÁVILA-PIRES, F. D. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, p.541-548, 2000.

PRABHAKARAN, V.; RAJSHEKHAR, V.; MURRELL, K. D.; OOMMEN, A. *Taenia solium* metacestodes glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.478-484, 2004.

PRABHAKARAN, V.; RAGHAVA, M. V.; RAJSHEKHAR, V.; MULIVIL, J.; OOMMEN, A. Seroprevalence of *Taenia solium* antibodies in Vellore district, south India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.246-250, 2008.

PRASAD, K. N.; PRASAD, A.; VERMA, A.; SINGH, A. K. Human cysticercosis and Indian scenario: a review. **Journal of Biosciences**, v.33, p.571-582, 2008.

PRETELL, E. J.; MARTINOT, C. J.; GARCIA, H. H.; ALVARADO, M.; BUSTOS, J. A.; MARTINO, T. C. Differential diagnosis between cerebral tuberculosis and neurocysticercosis by magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v.29, p.112-114, 2005.

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

RAMOS-ZÚÑIGA, R.; PÉREZ-GÓMEZ, H. R.; JÁUREGUI-HUERTA, F.; LÓPEZHERNÁNDEZ, M. D.; VALERA-LIZÁRRAGA, J. E.; PAZ-VÉLEZ, G.; BECERRA-VALDIVIA, A. Incidental consequences of antihelminthic treatment in the central nervous system. **World Neurosurgery**, v. 79, p. 149-153, 2013.

REVILLA-NUÍM, B.; MANGA-GONZÁLES, M. Y.; MIÑAMBRES, B.; GONZÁLEZ-LANZA, C. Partial characterization and isolation of 130 kDa antigenic protein of *Dicrocoelium dendriticum* adults. **Veterinary Parasitology**, v.134, p. 229-240, 2005.

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.; 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.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bulletin of the National Service of Army-Medical Department**, v.8, p.326-334, 1948.

SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International** 55(Suppl):S69-S73, 2006.

SALIM, L.; ANG, A.; HANDALI, S. Seroepidemiologic survey of cysticercosis-taeniasis in four central highland districts of Papua, Indonesia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.384-388, 2009.

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

SAWHNEY, I. M. S.; SINGH, G.; LEKHRA, O. P.; MATHURIYA, S. N.; PARIHAR, P. S.; PRABHAKAR, S. Uncommon presentations of neurocysticercosis. **Journal of Neurological Sciences**, v.154, p.94-100, 1998.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J. P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in human and pigs: an ancient parasitosis rooted in developing countries and emerging as a 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.

SHORT, J. A.; HEINER, D. C.; HSIAO, R. L.; ANDERSEN, F. L. Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1635-1639, 1990.

SILVA, C. V.; COSTA-CRUZ, J. M. A glance at *Taenia saginata* infection, diagnosis, vaccine, biological control and treatment. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v.10, p.313-321, 2010.

SILVA-VERGARA, M. L.; PRATA, A.; VELLOSO-NETTO, H. S.; FRANQUINI JÚNIOR, J.; VIEIRA, C. O.; CASTRO, J. H.; MICHELLETTI, L. G.; OTANO, A. S. Risk factors associated with taeniasis-cysticercosis in Lagamar, Minas Gerais State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.65-71, 1998.

SILVEIRA-LACERDA, E. P.; MACHADO, E. R.; ARANTES, S. C.; 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.

SORVILLO, F.; WILKINS, P.; SHAFIR, S.; EBERHARD, M. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.1-6, 2011.

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

SOTELO, J. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.11, p.529-535, 2011.

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

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

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, I. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.76, p.4350-4352, 1979.

VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (Eds.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap.20, p.177-184.

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

VERMA, A.; PRASAD, K. N.; CHEEKATLA, S. S.; NYATI, K. K.; PALIWAL, V. K.; GUPTA, R. K. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. **Medicine Microbiology Immunology**, v.4, p.255-261, 2011.

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

YAMASAKI, H.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; NAKAYA, K.; SATO, M. O.; ITO, A. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. **Parasitology International**, v.55, p. S81-S85, 2006.

YOUTDEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 32-35, 1950.

ZOLI, A.; SHEY-NJILA, O.; ASSANA, E.; NGUEKAM, J. P.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. **Acta Tropica**, v.87, p.35-42, 2003.

ZYMBERG, S.T. Neurocysticercosis. **World Neurosurgery**, 2012 (in press).

**ANEXO**

Artigo aceito para publicação (*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*),  
conforme segue carta de aceite:

----- Original Message -----

From: "Diagn Microbiol Infect Dis" <dmid@jmlabs.com>  
To: <costacruz@ufu.br>  
Sent: Tuesday, January 22, 2013 1:18 PM  
Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: DMID-12-744R1

**Title:** *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: Potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**

Dear Professor Julia Maria Costa-Cruz,

I wish to confirm acceptance your paper "*Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: Potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis." in **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.**

The editors and staff of Diagnostic Microbiology and Infectious Disease wish to thank you for submitting this manuscript. Please consider the journal in the future for the publication of you excellent work in this field.

With kind regards,  
Helio Sader, M.D., Ph.D.  
Associate Editor  
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease