

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação de frações antigênicas de *Taenia crassiceps* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico das formas ativa e inativa da neurocisticercose humana em amostras de líquido cefalorraquidiano

GABRIELA BORGES DA SILVA

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Avaliação de frações antigênicas de *Taenia crassiceps* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico das formas ativa e inativa da neurocisticercose humana em amostras de líquido cefalorraquidiano

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Imunologia e Parasitologia aplicadas.

Gabriela Borges da Silva

Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586a
2016 Silva, Gabriela Borges da, 1992
 Avaliação de frações antigênicas de *Taenia crassiceps* obtidas por hidrofobicidade, no imunodiagnóstico das formas ativa e inativa da neurocisticercose humana em amostras de líquido cefalorraquidiano / Gabriela Borges da Silva. - 2016.
 62 p. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
 Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Taenia - Teses. 3. Cisticercose cerebrospinal - Teses. 4. Líquido cefalorraquidiano - Teses. I. Cruz, Julia Maria Costa. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota”.

Theodore Roosevelt

Dedicatória

A Deus, por estar sempre presente em minha vida

À minha mãe, Sueli, por todo amor, compreensão e incentivo

MÃE...

“São três letras apenas,

As desse nome bendito:

Três letrinhas, nada mais...

E nelas cabe o infinito

E palavra tão pequena-confessam mesmo os ateus-

És do tamanho do céu

E apenas menor do que Deus”!

Mário Quintana

À minha família, meu porto seguro, por todo amor e apoio

Sem vocês, eu nada seria!!

A vocês, o meu muito obrigada!

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por seu imenso amor e por nunca me abandonar nos momentos mais difíceis da minha vida. Por todas as coisas boas, que me fazem tão feliz, e pelas ruins também, que me fazem crescer e me tornam cada dia mais forte.

À minha mãe, Sueli de F. P. B. Silva, por todo seu amor e dedicação em me tornar uma pessoa cada vez melhor. Por segurar na minha mão e me ajudar a levantar a cada queda, não me deixando desistir. Pelas palavras de incentivo, por ser a esperança quando tudo parece dar errado. Pelo que você fez e faz para ajudar a tornar meus sonhos realidade. À você, que me amou antes mesmo da minha existência, que é minha mãe, meu pai, minha amiga, minha inspiração. Que eu possa ser pelo menos um pouquinho do que você é! Te amo muito!

Ao meu pai, Manoel Luís da Silva, que mesmo não fazendo mais parte da minha vida, foi fundamental para que eu me tornasse hoje quem sou. A saudade é grande, mas tenho certeza que sua missão foi cumprida! Eu te agradeço por todo carinho e amor! Te amarei para sempre!

À minha família, em especial às minhas tias Joseli A. Pereira e Maria de Lourdes Silva, e às minhas primas, Taís M. Pereira e Tatiane C. Pereira, por acreditarem em mim, por todo carinho, por serem quem são! Vocês são muito especiais. Família, presente de Deus!

À minha orientadora, Profª Drª Julia Maria Costa Cruz, que mesmo me conhecendo a pouco tempo, acreditou em meu potencial e compartilhou comigo seus conhecimentos. Agradeço pela oportunidade, confiança, amizade e compreensão. Que Deus continue iluminando-a nessa longa jornada!

À Msc. Daniela da Silva Nunes e ao Msc. José Eduardo Neto de Sousa, por todo aprendizado, auxílio metodológico e amizade! Tenho vocês como exemplo de vontade e dedicação! Muito obrigada!

À Dr^a Vanessa da Silva Ribeiro e aos professores Dr. Cláudio Vieira da Silva, Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Dr. Jonny Yokosawa, pela participação e sugestões nas bancas de defesa e qualificação.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, por toda ajuda, conhecimento compartilhado e trabalho em equipe. Por todos os momentos felizes vividos e por me ampararem nos momentos mais difíceis e não me deixarem desistir!

Às colegas, Juliana Silva Miranda e Bianca Uliana do Laboratório de Alergia, que me auxiliaram em meus experimentos.

Às amigas Ariele Verônica da Silva, Karol Maira Dias, Keliane Dalpian e Laís Gabriel, mais que amigas, presentes de Deus! Agradeço pelo apoio nos momentos difíceis, pelos momentos felizes compartilhados e principalmente por fazerem parte da minha vida!

Às amigas Bárbara Cristina Krüger e Bruna Ribeiro e Letícia Rodrigues pela paciência, carinho e amizade! Obrigado por me acolherem no momento que mais precisei! São mais que especiais!

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, em especial à Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, pela paciência, carinho e conhecimento compartilhado, por ser essa

pessoa iluminada; e ao Marcelo Arantes Levenhagen, por ajudar a colocar em prática esta dissertação através de seus conhecimentos.

Aos colegas de pós-graduação, pelos momentos juntos vividos, em especial à minha amiga Paula Fernandes Santos, que tanto me ajudou nos momentos difíceis.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e à CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Agradeço à todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa jornada e contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal. À vocês, o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1 - Classificação taxonômica e caracterização morfológica de <i>Taenia solium</i>	14
1.2 - Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose	15
1.3 - Epidemiologia do complexo teníase-cisticercose	16
1.4 - Resposta imune e relação parasito-hospedeiro na neurocisticercose	17
1.5 - Aspectos clínicos da neurocisticercose	18
1.6 - Diagnóstico da neurocisticercose	20
1.7 –Fracionamento antigênico	23
2 – OBJETIVOS.....	25
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 - Aspectos éticos	26
3.2 - Caracterização dos grupos de estudo	26
3.2.1 - Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com neurocisticercose (Grupo 1)	26
3.2.2 - Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com outras desordens neurológicas (Grupo 2).....	27
3.3 - Manutenção da cepa e obtenção das formas metacestódeas de <i>Taenia crassiceps</i>	27
3.4 - Preparação do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i>	27
3.5 - Fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i> através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica	28
3.6 - Análise do perfil eletroforético do extrato salino e das frações antigênicas	29
3.6.1 - Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	29
3.7 - ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>Taenia</i> sp.	31
3.8 - Normas de biossegurança.....	31
3.9 - Análise estatística.....	32
4 – RESULTADOS.....	33
4.1 - Caracterização das três preparações antigênicas de <i>Taenia crassiceps</i>	33
4.2 - Verificação do potencial diagnóstico das frações obtidas no teste ELISA com amostras de LCR.....	33
5 – DISCUSSÃO.....	39
6 – CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXO	62

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

A – aquosa

(a) – verdadeiro positivo

(b) – falso positivo

(c) – falso negativo

(d) – verdadeiro negativo

D – detergente

v/v – volume por volume

1D – unidimensional

ASB-14 – *amidosulfobetaine-14* (amido sulfobetaina-14)

APS – *ammonium persulfate* (persulfato de amônio)

AUC – *area under curve* (área sob a curva)

CEUA – Comissão de Ética na Utilização de Animais

CEP/UFU – Comitê de Ética em Pesquisa/UFU

CHAPS – *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propanesulfonate*

(3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato)

cut-off – limiar de reatividade, ponto ótimo

DAB – diaminobenzidina

DO – densidade ótica

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático ligado a enzima)

Es – especificidade

ES – extrato salino total de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

FA – fração aquosa de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

FD – fração detergente de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

g – gravidade

G1 – grupo com diagnóstico definitivo para neurocisticercose

G2 – grupo com outras desordens neurológicas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – 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 – quilohertz
L – litro
LCR – líquido cefalorraquidiano
M – molaridade
mA – miliamperagem
mg – miligrama
mL – mililitro
mM – milimolar
NaCl – cloreto de sódio
NCC – neurocisticercose
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – ortofenilenodiamina
p – nível de significância
PA – para análise
PBS – phosphate buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)
PBS-T – PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%
PBS-TM – PBS-T acrescido de leite desnatado
pH – potencial hidrogeniônico
PM – peso molecular
PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonil
RM – ressonância magnética
SDS – *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
Se – sensibilidade
SNC – sistema nervoso central

TA – temperatura ambiente

TBS – solução salina tamponada com Tris

TC – tomografia computadorizada

TEMED – *N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine* (N N, N', N'- tetrametiletienoldiamina)

Th1 – linfócitos T *helper* 1

Th 2 – linfócitos T *helper* 2

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

TX-100 – triton X-100

TX-114 – triton X-114

T $\gamma\delta$ – linfócito T gama-delta

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

V – volt

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrômetro

RESUMO

A neurocisticercose (NCC) é uma parasitose que acomete o sistema nervoso central (SNC) humano e é causada pela forma metacestódea de *Taenia solium*. NCC é uma doença pleomórfica devido as diferenças no número e localização das lesões e gravidade da reação imune do hospedeiro contra o parasito. Apesar dos avanços na neuroimagem e testes imunológicos, o diagnóstico da NCC ainda é um desafio devido às manifestações clínicas inespecíficas. A dificuldade de obtenção dos metacestódeos, a partir de suínos naturalmente infectados, tem estimulado a busca por antígenos heterólogos, como os de *Taenia crassiceps*, mantidos em modelo experimental. O estudo objetivou avaliar o extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps* (ES) e suas frações antigênicas (detergente - FD e aquosa - FA) obtidas por hidrofobicidade através do uso de Triton X-114, aplicadas em um método imunológico alternativo para o diagnóstico da NCC humana ativa e inativa em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), método simples e de baixo custo. O extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps* e suas frações foram testados por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) para detecção de imunoglobulinas G (IgG). FD e FA demonstraram altos índices de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) no imunodiagnóstico da NCC ativa e inativa (100%) quando comparadas com o extrato salino total (Se = 100% e Es = 93%, ativa; Se = 95% e Es = 93%, inativa). Os resultados demonstraram que ambas as frações, FD e FA são importantes, eficientes e potencialmente aplicáveis no diagnóstico da NCC ativa e inativa.

Palavras-chaves: *Taenia crassiceps*; triton X-114; diagnóstico; neurocisticercose; líquido cefalorraquidiano.

ABSTRACT

Assessment of *Taenia crassiceps* antigenic fractions obtained by hydrophobicity in the immunodiagnosis of active and inactive forms of human neurocysticercosis in cerebrospinal fluid samples

The neurocysticercosis (NCC) is parasitic disease that affects the human central nervous system (CNS) and is caused by metacestodes of *Taenia solium*. NCC is a pleomorphic disease due to differences in the number and location of the lesions and the severity of the immune reaction of the host against the parasite. Despite advances in neuroimaging and immunological tests, NCC diagnosis still is a challenge due to the nonspecific clinical manifestations. The difficulty of obtaining metacestodes of naturally infected pigs has stimulated the search for heterologous antigens, such as *Taenia crassiceps*, kept in experimental model. The study aimed to evaluate the total extract of metacestodes of *Taenia crassiceps* (SE) and its antigenic fractions (detergent - DF and aqueous - AF) obtained by hydrophobicity through the use of Triton X-114, applied in an alternative method for the immunological diagnosis of active and inactive human NCC in cerebrospinal fluid (CSF), a low cost and rapid technique. The total saline extract of metacestodes of *T. crassiceps* and their antigenic fractions were tested by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for detection of immunoglobulin G (IgG). DF and AF showed high sensitivity (Se) and specificity (Sp) indexes in immunodiagnosis of active or inactive NCC (100%) when compared with saline total extract (Se = 100% and Sp = 93%, active; Se = 95% and Sp = 93%, inactive). The results demonstrated that both fractions, DF and AF are important, efficient and potentially applicable in the diagnosis of active and inactive NCC.

Keywords: *Taenia crassiceps*; triton X-114; diagnosis; neurocysticercosis; cerebrospinal fluid.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação taxonômica e caracterização morfobiológica de *Taenia solium*

A espécie *T. solium* (1758) pertence ao reino Animalia, ao filo Platyhelminthes, a classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, família Taeniidae e ao gênero *Taenia*. A classe Cestoda compreende parasitos hermafroditas, de tamanhos variados, cujo corpo é achatado dorsoventralmente e dividido em escólex ou cabeça, colo ou pescoço e estróbilo ou corpo. O parasito adulto das espécies do gênero *Taenia* apresenta o corpo leitoso, sendo *T. solium* de comprimento médio de 1,5 a 4 metros. O escólex de *T. solium* é globoso, apresenta quatro ventosas arredondadas e proeminentes que facilitam a fixação do parasito à mucosa do intestino delgado; possui rostro ou rostelo armado, com dupla fileira de acúleos (situado entre as ventosas) (25 a 50) (HOBERG et al., 2000; HOBERG, 2002; DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011).

O estróbilo de *T. solium* é constituído de numerosas proglotes, de 800 a 900 por parasito. As proglotes apresentam estágios de desenvolvimento diferentes: jovens, maduras e grávidas (GARCIA et al., 2002; REY, 2008), e possuem individualidade reprodutiva e alimentar (DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011). Cada proglote contém aproximadamente 50.000 ovos, sendo as últimas, grávidas, eliminadas juntamente com as fezes (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006).

Os ovos de tenídeos são esféricos, morfologicamente indistinguíveis, medem cerca de 30 µm de diâmetro, permanecem viáveis por mais de oito meses sob condições ambientais adequadas (loais quentes e úmidos), aumentando assim a possibilidade de transmissão. Internamente, são constituídos pelo embrião hexacanto ou oncosfera e, externamente, por um envoltório denominado embrióforo (DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011).

O embrião hexacanto desenvolve-se na forma metacestódea, que é constituída de uma vesícula translúcida com líquido claro, contendo no seu interior um escólex invaginado, sendo que a forma metacestódea de *T. solium* possui rostro armado com acúleos e a de *T. saginata* não. Durante a permanência nos tecidos, os metacestódeos passam por modificações anatômicas e fisiológicas, podendo ser encontrado no estágio vesicular, no qual a larva apresenta uma vesícula com líquido incolor e escólex normal; o estágio coloidal, com o líquido vesicular turvo e o escólex em degeneração; o estágio granular, em que ocorre espessamento da membrana e mineralização do escólex, que apresenta um aspecto granular; e finalmente o estágio granular calcificado, no qual a calcificação é completa (HAWK et al., 2005; FLISSER;

RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM III, 2006; REY, 2008; DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011).

1.2 Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose

O homem é o único hospedeiro definitivo, que alberga o parasito adulto, das espécies *T. solium*, *T. saginata* e *T. asiática*. Os hospedeiros intermediários, que abrigam as formas metacestódeas, são os suínos para *T. solium* e *T. asiatica*, e os bovinos para *T. saginata*. Acidentalmente, o homem também pode se comportar como hospedeiro intermediário de *T. solium* (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; REY, 2008; DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011; GALÁN-PUCHADES; FUENTES, 2013).

A teníase ocorre quando o hospedeiro humano ingere as carnes ou vísceras de suínos, ou carne bovina, cruas ou mal cozidas, infectadas, com formas metacestódeas viáveis de *Taenia* sp. (EOM; RIM, 1993; GALÁN-PUCHADES; FUENTES, 2013). Quando o metacestódeo ingerido sofre ação do suco gástrico, ele evagina-se e fixa-se, por meio do escólex, na mucosa do intestino delgado, onde desenvolve-se em parasito adulto. Cerca de três meses após a ingestão do metacestódeo, inicia-se a eliminação de ovos e proglotes grávidas (REY, 2008).

A cisticercose humana ocorre pela ingestão acidental de ovos viáveis da *T. solium* que foram eliminados nas fezes de portadores de teníase, através de três mecanismos: pela autoinfecção externa, quando proglotes grávidas e ovos são eliminados e levados à boca pelas mãos contaminadas; pela autoinfecção interna, durante vômitos ou movimentos retroperistálticos do intestino, possibilitando presença de proglotes grávidas ou ovos de *T. solium* no estômago, que vão ser ativados e desenvolver o ciclo auto-infectante; pela heteroinfecção, pela ingestão de alimentos ou água contaminados com os ovos da *T. solium* disseminados no ambiente através das dejeções de outro indivíduo portador e; por meios alternativos, como a coprofagia nos psicopatas (HOBERG, 2002; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Em relação ao seu habitat, *T. solium*, na fase adulta ou reprodutiva, vivem no intestino delgado humano; os metacestódeos de *T. solium* no ser humano alojam-se nos tecidos subcutâneos, músculos esqueléticos, coração, pulmões, ossos, cavidade oral, medula espinhal e no SNC (SOBNACH et al., 2009). O SNC constitui a localização mais importante, causando a NCC, forma mais grave (e frequente) da doença (COSTA-CRUZ, 1995; BRUNETTI; WHITE Jr, 2012).

1.3 Epidemiologia do complexo teníase-cisticercose

O complexo teníase-cisticercose engloba duas doenças distintas: a teníase e a cisticercose, que apresentam sintomatologia e epidemiologia diferentes. As doenças são causadas pelo parasito *Taenia solium* (HOBERG, 2002) em fases diferentes de seu ciclo de vida. Alguns fatores, como a ausência de saneamento básico, a vigilância sanitária deficiente e falta de educação sanitária potencializam esse complexo. São zoonoses cosmopolitas de grande importância médica, veterinária e econômica, prevalente em países em vias de desenvolvimento, sobretudo em países da Ásia, África e América Latina (FLISSER et al., 2003; SARTI; RAJSHKHAR, 2003; KUMAR, 2004; MEDINA et al., 2005; MENDLOVIC et al., 2014; RON-GARRIDO et al., 2015; TREVISAN et al., 2015; MARTINS-MELO et al., 2016; THOMAS et al., 2016), incluindo pacientes de todas as idades (DEL BRUTTO, 2014; SAHU et al., 2014).

De acordo com a estimativa Organização Mundial da Saúde (OMS), a NCC é uma doença tropical negligenciada e acomete aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo, ocorrendo cerca de 50.000 mortes por ano (BOUTEILLE, 2014; MEGUINS et al., 2015).

A cisticercose afeta indivíduos nos países em desenvolvimento (AYALA-SULCA; MIRANDA-ULLOA, 2015; RON-GARRIDO et al., 2015; TREVISAN et al., 2015; MARTINS-MELO et al., 2016; THOMAS et al., 2016) e em países desenvolvidos com considerada taxa de imigração a partir de áreas endêmicas (WHITE Jr, 2000; DEGIORGIO; PIETSCHESCUETA; TSANG, 2005; KRAFT, 2007, SIKASUNGE et al., 2007). Embora a forma larval do parasito possa se desenvolver em alguns órgãos no corpo, a forma metacestódea no cérebro ou medula espinhal (NCC) é a forma mais grave de infecção (MEWARA; GOYAL; SEHGAL, 2013).

Em muitas comunidades endêmicas, a NCC é a causa de epilepsia em cerca de 1% da população. Nas últimas décadas, ganhou ainda mais importância à medida que ela se espalhou para áreas até então desconhecidas por não serem endêmicas, como os Estados Unidos da América (EUA) e Austrália (SCIUTTO et al., 2000; O'NEAL; FLECKER, 2015). Nessas áreas não endêmicas, como em alguns estados do oeste dos EUA, a prevalência de NCC é 0,2-0,6 por 100.000 habitantes, e é diagnosticada em mais de 2% dos pacientes atendidos por causa de convulsões. Esta diversidade epidemiológica pode ser atribuída a intensificação no consumo de produtos animais, aumento da produção de carne no mundo e comércio de animais vivos, larga escala de migração intra e inter-países de trabalhadores (mão de obra) e turismo internacional. Enquanto isso, a prevalência da NCC nos países em desenvolvimento, tanto em áreas urbanas

quanto em rurais, está diminuindo. Fatores como aumento na cobertura do saneamento básico, amplo uso de medicamentos anti-helmínticos, e uma maior sensibilização da população em geral podem ter contribuído para essa queda no número de casos de NCC em países endêmicos (SCIUTTO et al., 2000). A prevalência mundial da NCC ainda requer ser conhecida, e iniciativas estão a caminho para determiná-la em países endêmicos tão bem como em nações desenvolvidas, como os Estados Unidos da América (MEWARA; GOYAL; SEHGAL, 2013; FOGANG et al., 2015; O'NEAL; FLECKER, 2015).

No Brasil, a NCC é encontrada com elevada frequência nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001). A maioria dos casos são relatados de forma restrita por centros especializados de neurologia e neurocirurgia, ou a partir da análise de materiais anátomo-patológicos, provenientes de hospitais psiquiátricos e comuns. No entanto a prevalência populacional não é conhecida devido à baixa notificação da doença (MARTINS-MELO et al., 2016). Segundo o estudo de SILVEIRA-LACERDA et al. (2002), tem-se demonstrado que a região do Triângulo Mineiro apresenta provável endemicidade de cisticercose, visto que constatou-se considerável soroprevalência da cisticercose em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre (4,8%), e Uberlândia (4,7%).

1.4 Resposta imune e relação parasito-hospedeiro na neurocisticercose

A resposta imune contra a NCC humana pode variar desde uma baixa ou moderada resposta (assintomática) até uma resposta inflamatória grave (sintomática) (os parasitos viáveis causam pouca inflamação, na maioria das vezes, resultando nos casos assintomáticos de NCC). No entanto uma intensa resposta inflamatória ocorre no tecido do hospedeiro na maioria dos casos sintomáticos. Os efeitos patológicos, bem como a atividade epileptogênica causada pelo parasito, deve-se à resposta inflamatória (MOURA et al., 2015), que é provocada pela destruição do cisticerco com a liberação de grandes quantidades de citocinas (SOTELO; MARIN, 1987; GARCIA; RODRIGUEZ; FRIEDLAND, 2014). Participam desta resposta imune células plasmáticas, linfócitos, eosinófilos e macrófagos. Citocinas dos perfis Th1 e Th2 são encontradas em tecidos que circundam o metacestódeo (RESTREPO et al., 2001).

A tolerância imunológica, normalmente, ocorre quando um parasito viável é visto com pouca ou nenhuma resposta inflamatória (CARPIO; ESCOBAR; HOUSER, 1998). Uma resposta imune intensa está associada com cisto coloidal ou em degeneração (WHITE Jr et al., 1997). Quando um parasito começa a involuir e morre, é desenvolvida uma resposta

inflamatória que tende para a formação de um verdadeiro granuloma, com gigantócitos (REY, 2008).

A resposta imunológica celular de pacientes com cisticercose ainda não está bem estabelecida, no entanto, aumentos de linfócitos T e B foram observados, assim como os níveis de eosinófilos no sangue e no LCR. Linfócitos $T\gamma\delta$ do perfil Th1 são uma das principais células responsáveis pela resposta inflamatória, com um papel no desenvolvimento da neuropatologia e na gravidade da NCC (CARDONA et al., 1999; RESTREPO et al., 2001; DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011).

Os antígenos de metacestódeos induzem aumento na produção das imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE no soro e no LCR de indivíduos com NCC. Na resposta humoral destacam-se os anticorpos IgG, que são encontrados em níveis superiores às demais classes de imunoglobulinas em diferentes amostras biológicas, sendo detectados em amostras de soro e de LCR (COSTA et al., 1982; BUENO et al., 2000b; PARDINI et al., 2002). Há um aumento menos acentuado de IgE, IgM e de IgA (REY, 2008; DA SILVA; TAKAYANAGUI in NEVES, 2011) no soro de pacientes. Em um estudo desenvolvido por Odashima, Takayanagui e Figueiredo (2002) observou-se que há elevação de anticorpos específicos das classes IgG, IgM, IgE e IgA no LCR.

Nos estádios tardios da doença, os linfócitos $T\gamma\delta$ do perfil Th1 podem levar a uma modificação do local de migração de macrófagos, induzindo a formação de macrófagos ativados alternativamente. Estes são considerados responsáveis pela imunorregulação da resposta inflamatória, pois apresentam atividade supressiva (TERRAZAS, 2008; FREITAS et al., 2012). Assim, a hipótese de que os parasitos mantêm um equilíbrio com a resposta imune do hospedeiro durante a fase inicial da infecção e perde o mesmo por interrupção da resposta imunitária de Th2 é sustentada por essas descobertas (MOURA et al., 2015).

1.5 Aspectos clínicos da neurocisticercose

Pacientes com NCC podem permanecer assintomáticos por meses a anos, apresentar a forma grave da doença e até mesmo evoluir para óbito, e comumente o diagnóstico é acidental quando a neuroimagem é realizada (SAHU et al., 2014; FOGANG et al., 2015).

As manifestações da NCC dependem do número, tipo, tamanho, localização e estágio de desenvolvimento da forma metacestódea e da resposta imune do hospedeiro (PAL; CARPIO; SANDER, 2000; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; CARABIN et al., 2011; DEL BRUTTO; DEL BRUTTO, 2013; JOHN et al., 2015; DEL BRUTTO et al., 2016). Da

conjunção destes fatores resulta o quadro pleomórfico, com múltiplos sinais e sintomas neurológicos (TAKAYANAGUI, 1994a; TAKAYANAGUI, 1994b), não existindo o quadro patognomônico (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Os cisticercos distribuem-se no cérebro, na região do parênquima e/ou extraparenquimal, como nos espaços subaracnóide, ventrículos e na medula. Os pacientes podem apresentar diferentes estados e processos patológicos, sendo que um único paciente pode ter múltiplos cisticercos parenquimatosos, alguns viáveis com pouca inflamação, outros em vários estágios de degeneração com diferentes graus de inflamação, lesões calcificadas de cistos ventriculares e hidrocefalia (NASH; GARCIA, 2011). O parasito encistado apresenta três fases distintas de evolução: fase ativa, na qual o parasito está vivo; fase transicional, na qual o parasito começa a degenerar e é combatido pelo sistema imune do hospedeiro; e a fase inativa, na qual o parasito está morto mas apresenta um nódulo calcificado (KELVIN et al., 2011).

A NCC é possivelmente a infecção mais heterogênea do sistema nervoso central, com uma ampla variedade de manifestações clínicas (KELVIN et al., 2011), porém, o sintoma mais comum é a convulsão. Relatos sugerem que convulsões são as manifestações mais frequentes nos casos de cistos localizados no parênquima cerebral (SCHARF, 1988; SHANDERA et al., 1994; TREVISOL-BITTENCOURT; DA SILVA; FIGUEREDO, 1998; GARCIA, 2003; KIM et al., 1999; SANDMAN; BITTENCOURT, 2002; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006), em pacientes com cistos nas três fases de evolução (ativa, transicional e inativa) (WHITE Jr; ROBINSON; KUHN, 1997; CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998). Sinais neurológicos focais tem sido descritos em até 20% dos pacientes com NCC. Sinais do trato piramidal predominam, déficits sensoriais, distúrbios de linguagem, movimentos involuntários, rigidez parkinsoniana e sinais de disfunção do tronco cerebral podem ocorrer em alguns pacientes (DEL BRUTTO, 2012). Manifestações como crises epiléticas, síndrome de hipertensão intracraniana, meningite cisticercótica, distúrbios psíquicos e síndrome medular também podem suceder (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; AGAPEJEV, 2003).

1.6 Diagnóstico da neurocisticercose

Baseado em achados clínicos, o diagnóstico da NCC é difícil, pois seus sinais e sintomas não são específicos (MACHADO et al., 2013; SAKO et al., 2015). Assim, o mesmo é baseado também em achados epidemiológicos, laboratoriais e por técnicas de imagem (MACHADO et al., 2007; FOGANG et al., 2015; TSCHERPEL et al., 2015).

É conclusivo se realizada demonstração do cisticerco por técnicas histopatológicas, em material de biópsia de uma lesão cerebral ou medular; visualização do escólex, por tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM); e exame de fundo de olho, em casos de cisticercose intraocular (DEL BRUTTO et al., 2001). Na impossibilidade de demonstração direta do parasito, a análise em conjunto de dados clínicos e epidemiológicos e testes laboratoriais constituem critérios complementares de diagnóstico da NCC na maioria dos casos (DEL BRUTTO et al., 1996; GARG, 2004; FOGANG et al., 2015).

O método de escolha para o diagnóstico da NCC é a neuroimagem, pois determina a necessidade de um tratamento médico ou cirúrgico e avalia a eficácia das intervenções (FOGANG et al., 2015). TC e RM são exames de imagem considerados por alguns autores como padrão-ouro no diagnóstico da NCC, pois permitem a visualização do parasito e do processo reacional do hospedeiro (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998; AMARAL et al., 2003; MARTINS-MELO et al., 2016). A TC apresenta maior sensibilidade na detecção de metacestódeos calcificado. Já a RM, por possuir maior poder de resolução, pode evidenciar o escólex e os metacestódeos localizados nos ventrículos (WHITE Jr, 2000). No entanto as técnicas de imagem não conseguem detectar os metacestódeos alojados na cisterna basal subaracnoide ou os parasitos em fase de degeneração ou pré-calcificação, e podem ignorar a infecção quando o número de parasitos é baixo (TOGORO; SOUZA; SATO, 2012; SAKO et al., 2013). Além disso, atribui-se ao alto custo dessas tecnologias a dificuldade de acesso a este tipo de diagnóstico por indivíduos residentes em países endêmicos, visto que a principal população de risco é, na maioria das vezes, rural (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; RAJKOTIA et al., 2007).

Por estas razões, os imunoensaios, que são padronizados para um apropriado diagnóstico da NCC, conduzem a uma melhor gestão clínica de pacientes com NCC, pois os imunoensaios auxiliam no diagnóstico em pacientes com perfil clínico e de imagem compatíveis com NCC (MICHELET et al., 2011). Dentre os métodos imunológicos, ELISA e *immunoblotting* são os mais utilizados para detectar anticorpos contra antígenos de *Taenia* sp. em amostras de LCR ou soro, porém, estes testes têm apresentado diferentes graus de

sensibilidade e especificidade, dependendo do método de preparação de antígeno utilizado (SHIGUEKAWA et al., 2000; BARCELOS et al., 2007; DECKERS; DORNY, 2010; GONÇALVES et al., 2010; MICHELET et al., 2011, FERRER et al., 2012; SAKO et al., 2015). Recomenda-se que dois testes imunológicos sejam empregados, um de elevada sensibilidade e outro de elevada especificidade, para que os resultados sejam interpretados com uma maior segurança (COSTA-CRUZ, 1995; VAZ; LIVRAMENTO, 1996; DEL BRUTTO, 2012).

Devido à inespecificidade das manifestações clínicas, o diagnóstico da neurocisticercose ainda é um desafio em muitos pacientes. Apesar dos avanços na neuroimagem e testes de imunodiagnóstico, na maioria das vezes, os achados de neuroimagem não são patognômicos e os testes sorológicos apresentam problemas relacionados com a sensibilidade e especificidade relativamente baixas (COSTA-CRUZ, 1995; RIBEIRO et al., 2014). No entanto, testes imunológicos como ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e *Immunoblotting* são comumente utilizados para detectar anticorpos anti-*T. solium* (SAKO et al., 2015), utilizando líquido cefalorraquidiano (LCR) (COSTA et al., 1982; COSTA, 1986; FLEURY et al., 2003; BARCELOS et al., 2005; BARCELOS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; NUNES et al., 2010), soro (RIBEIRO et al., 2010a; MANHANI et al., 2011; NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014) e/ou saliva (BUENO et al., 2000a; MALLA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010).

Diferentes extratos antigênicos de metacestódeos de *T. solium*, tais como solução salina, líquido de vesícula, alcalino, de escólex ou de membrana têm sido utilizado no teste ELISA para o diagnóstico da NCC e demonstraram diferenças em termos de sensibilidade e especificidade no ELISA (COSTA, 1986; BASSI et al., 1991; BOBES et al., 2006; BUENO et al., 2000b; NUNES et al., 2013; SAKO et al., 2015), assim como o *immunoblotting*, que também apresenta diferentes índices de sensibilidade e especificidade, dependendo da preparação antigênica usada no teste ELISA (ARRUDA et al., 2005; BUENO et al., 2000b; BUENO et al., 2001; BUENO et al., 2005; AYALA-SULVA; MIRANDA-ULLOA, 2015).

Apesar da maioria dos trabalhos publicados relatar o uso do antígeno homólogo obtido a partir da forma metacestódea de *T. solium*, a procura por outras fontes antigênicas tem sido estimulada devido à dificuldade de obtenção dos metacestódeos, a partir de suínos naturalmente infectados (ARRUDA et al., 2005). Destas fontes, destacam-se duas alternativas: metacestódeos de *Taenia crassiceps* (LARRALDE et al., 1989; BARCELOS et al., 2001; BUENO et al., 2001; PARDINI et al., 2002; DORNY et al., 2003; BARCELOS et al., 2005; ESPÍNDOLA et al., 2005; SUZUKI et al., 2007; MATOS-SILVA et al., 2012; HAMAMOTO

FILHO et al., 2015; GARCÍA-MONTOYA et al., 2016) e metacestódeos de *Taenia saginata* (OLIVEIRA et al., 2009, NUNES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; NUNES et al., 2013).

Os antígenos de metacestódeos de *T. crassiceps* (cepa ORF) representa uma fonte de antígenos importante, já que de acordo com estudos comparativos, com antígenos homólogos em amostras de líquido cefalorraquidiano, pode ser utilizado para o imunodiagnóstico da NCC humana. A aplicação desses antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da cisticercose e NCC humana tem sido descrita em vários estudos (LARRALDE et al., 1989; VAZ et al., 1997; BUENO et al., 2000b; GOMES et al., 2007; VAZ, 2007; ISHIDA et al., 2011; TOGORO; SOUZA; SATO, 2012; GARCÍA-MONTOYA et al., 2016).

Taenia crassiceps é um parasito com possibilidade de manutenção experimental em animais de pequeno porte, sendo a cepa ORF mantida por reprodução assexuada em peritônio de camundongos fêmea da linhagem BALB/c, no qual o parasito se reproduz por brotamento, gerando vesículas visíveis na cavidade peritoneal de camundongos, proporcionando uma medida precisa da carga parasitária. Além disso, o parasito apresenta como vantagem a raridade de relatos de casos humanos (WILLMS; ZURABIAN, 2010; SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011; GARCÍA-MONTOYA et al., 2016). O modelo experimental para o desenvolvimento do estágio larvário de *T. crassiceps* em camundongo BALB/c foi selecionado por ser um modelo de laboratório relativamente simples (SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011). O parasito apresenta transmissão zoonótica, que inclui raposas, cães e felinos como hospedeiros da forma adulta do parasito. Seu estágio larval é encontrado em camundongos, coelhos e outros roedores, que se comportam como hospedeiros intermediários. Em roedores, os metacestódeos geralmente apresentam localização subcutânea, no músculo, mas não nos olhos ou sistema nervoso, sendo a NCC documentada no cérebro dos ratos e gatos e na medula de primatas não humanos (FANKHAUSER et al., 1967; FREEMAN et al., 1973; RIETSCHER, 1981; WUNSCHMANN et al., 2003; LESCANO; ZUNT, 2013).

Os humanos atuam como hospedeiro intermediário de *T. crassiceps*, no qual um sistema imune debilitado pode desempenhar um papel na facilitação do desenvolvimento do parasito. Em indivíduos imunossuprimidos, *T. crassiceps* tem sido observado, principalmente, nos braços; nos indivíduos imunocompetentes, o parasito infecta os olhos. No entanto a descrição de *T. crassiceps* no SNC humano não é completamente improvável (TANOWITZ et al., 2001; LESCANO; ZUNT, 2013).

1.7 Fracionamento antigênico

O fracionamento com Triton X-114 (TX-114) permitiu a obtenção da fração detergente a partir de metacestódeos de *T. solium* e *Taenia saginata*. As frações detergentes apresentaram boa sensibilidade e especificidade através da utilização dos testes ELISA e *Immunoblotting* (MACHADO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010). Para o imunodiagnóstico da NCC, é usualmente aplicada a detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* (e de antígenos circulantes do parasito) em amostras de soro e LCR, no entanto estudos que identifiquem proteínas específicas ainda são necessários para que o correto diagnóstico da NCC seja possível (COSTA, 1986; SCIUTTO et al., 2000; DORNY et al., 2003; DECKERS; DORNY, 2010; MICHELET et al., 2011).

A separação de proteínas pode ser realizada por meio da utilização de vários reagentes, por diferentes técnicas. A utilização de detergente não iônico Triton X-114 (TX-114) em fracionamentos envolvem procedimentos simples, que são capazes de separar proteínas hidrofílicas de proteínas hidrofóbicas, presentes em um organismo. A solução detergente TX-114 possui forma homogênea a 0°C, mas em temperaturas superiores a 20°C possui a capacidade de separar-se em fase aquosa e fase detergente. Durante o processo de fracionamento as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fase aquosa e as proteínas integrais de membrana são recuperadas na fase detergente (BORDIER, 1981; NORTHERN, et al., 1989).

Resultados satisfatórios têm sido obtidos com a utilização da fração hidrofóbica (detergente) recuperada durante os protocolos de fracionamento, demonstrando ser um candidato a antígeno promissor, utilizando o teste ELISA com considerável sensibilidade, especificidade e segurança. Por isso, este procedimento tem sido aplicado por vários autores (COLLÉN et al., 2002; MACHADO et al., 2007; FELICIANO et al., 2010; GONÇALVES et al., 2010; TOGORO; SOUZA; SATO, 2012). Os procedimentos que utilizam TX-114 para fracionamento são simples, considerados econômicos e altamente eficientes; apresentam vantagens quando comparado a outros métodos de fracionamento, uma vez que não necessitam de vários ciclos de centrifugação ou de equipamentos especializados. Quando comparado com extrações que utilizam solventes orgânicos, apresentam baixa toxicidade (BORDIER, 1981; BRICKER et al., 2001; MANZOORI; BAVILI-TABRIZI, 2002). Além do Triton X-114, outros detergentes têm demonstrado eficiência quando utilizados no imunodiagnóstico da cisticercose humana. O estudo realizado por Navarrete-Perea et al. (2015) demonstrou uma

ótima extração utilizando uma combinação de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato (CHAPS), amido sulfobetaína-14 (ASB-14) e Triton X-100 (TX-100).

Diante da importância do aperfeiçoamento e do desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas que sejam viáveis técnica e financeiramente, o presente estudo estabeleceu um novo protocolo de obtenção antigênica para o imunodiagnóstico de pacientes com NCC a partir de *T. crassiceps*.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o extrato salino total e suas frações antigênicas obtidas por hidrofobicidade (detergente e aquosa) de *Taenia crassiceps* (antígeno heterólogo) através do uso de Triton X-114 em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) no diagnóstico das formas ativa e inativa da NCC humana

Objetivos específicos

- Fracionar o ES por meio do uso de Triton X-114, para obtenção das frações hidrofóbica (detergente) e hidrofílica (aquosa);
- Detectar anticorpos IgG específicos em amostras de LCR humano pelo teste ELISA;
- Comparar o potencial diagnóstico do ES e das frações obtidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa-Cruz.

As amostras de líquido que foram utilizadas 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 de Nº 041/2008.

As formas metacestódeas de *Taenia crassiceps* disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, foram obtidas do peritônio de camundongos fêmea BALB/c (cepa ORF). A manutenção experimental da cepa foi aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU (CEUA/UFU) sob o protocolo de Nº 096/2014.

3.2 Caracterização dos grupos de estudo

Um total de 80 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) disponíveis no Banco de Amostras Biológicas, no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU foram utilizadas para validação dos testes diagnósticos. Estas amostras de LCR são provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia da Universidade Federal de Uberlândia (HCU/UFU).

As amostras foram distribuídas em dois grupos de estudo: pacientes com neurocisticercose (Grupo 1) e pacientes com outras desordens neurológicas (Grupo 2).

3.2.1 Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com neurocisticercose (Grupo 1)

Foram utilizadas 40 amostras de LCR de pacientes com diagnóstico definitivo de acordo com os critérios propostos por Del Brutto *et al.* (1996) (Anexo), sendo considerado como diagnóstico definitivo para NCC a presença de dois critérios maiores. O Grupo 1 foi dividido em NCC ativa (n = 20) e NCC inativa (n = 20), e os pacientes foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em que se encontrava a forma metacestódea (vesicular, coloidal, granular nodular e granular calcificado), sendo portadores de NCC ativa quando a

forma metacestódea se encontrava nos estágios vesicular, coloidal e granular nodular; e como portadores da NCC inativa quando a mesma se encontrava no estágio granular calcificado (SOTELO; GUERRERO; RUBIO, 1985). Pacientes com a forma mista da doença foram classificados como portadores de NCC ativa.

3.2.2 Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com outras desordens neurológicas (Grupo 2)

Foram utilizadas 40 amostras de LCR de pacientes com outras manifestações neurológicas que apresentaram neuroimagem e sorologia (teste ELISA no LCR) negativos para neurocisticercose. As desordens neurológicas avaliadas neste grupo foram: cefaleia (n = 11), crise convulsiva (n = 14), epilepsia (n = 4), esclerose múltipla (n = 3), hidrocefalia (n = 2), meningite viral (n = 1), meningite bacteriana (n = 1), neurotoxoplasmose (n = 2) e neurocriptococose (n = 2).

3.3 Manutenção da cepa e obtenção das formas metacestódeas de *Taenia crassiceps*

Após sacrifício utilizando overdose de anestésicos (Cloridrato de Ketamina 10% e Cloridrato de Xilazina 2%), os metacestódeos de *T. crassiceps* foram obtidos do peritônio de camundongos fêmea da linhagem BALB/c, lavados em solução salina (NaCl 0,15 M) por quatro vezes sem centrifugação, e separados. Os metacestódeos viáveis e de pequeno tamanho foram selecionados e inoculados em novos camundongos fêmea da linhagem BALB/c (30 metacestódeos + PBS/seringa, volume total de 1mL). Após três meses (tempo necessário para reprodução do parasito), o processo de sacrifício e inoculação foi realizado. Os metacestódeos de *T. crassiceps* que não foram utilizados para inoculação foram identificados e armazenados a -20°C.

3.4 Preparação do extrato salino total de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

Os metacestódeos (150, aproximadamente) foram ressuspensos em 5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 mol/L, pH 7,2) com a adição de inibidores de protease (mini-ULTRA completa, Roche, Mannheim, Alemanha) e rompidos em cinco ciclos de maceração, com a utilização de nitrogênio líquido. Após os ciclos de maceração em cadinho, a suspensão foi submetida a centrifugação a 12.500 rpm durante 30 min a 4°C. O sobrenadante

foi colhido e a dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina a 10% (Sigma Chem. Co., EUA)

3.5 Fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de *Taenia crassiceps* através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica

As frações antigênicas hidrofóbica e hidrofílica de *Taenia crassiceps* foram obtidas através do fracionamento com Triton X-114 (TX-114) (Sigma Chem. Co., EUA), como descrito por Bordier (1981), com algumas modificações. O processo de fracionamento iniciou-se a partir de uma massa proteica de 4 mg do extrato salino (ES), que foi obtido conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4. Ao ES foram adicionados 800 µL de Tris (10 mM Tris-HCL, pH 7,4, 150 mM de NaCl) e 1% de TX-114 (10 µL para cada 1 mL da solução anterior). A solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos (1ª etapa). Para separação das proteínas um gradiente de 6% de sacarose, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl e 0,06% de TX-114 foi adicionado, na proporção de 2:3 (v), e incubado a 37°C por 10 minutos (2ª etapa). A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3000 X g a 4°C (3ª etapa). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de fundo cônico e a fração mais densa (detergente) foi armazenada no mesmo tubo (4ª etapa). Ao sobrenadante obtido na 4ª, foi adicionado (1:1) Tris acrescido de 4% de TX-114. Esta solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos, posteriormente a 37°C por 10 minutos, e centrifugada a 3000 X g a 4°C por 10 minutos (5ª etapa). O sobrenadante desta etapa constituiu a fração aquosa (FA), sendo os sedimentos descartados.

As frações detergente e aquosa purificadas (extrato salino detergente – FD; e extrato salino aquoso - FA) foram precipitadas em acetona PA (Merck, RJ, Brasil) na proporção de 1:2 (v/v), a 4°C, *overnight*, e centrifugadas a 3000 X g, a 4°C, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os precipitados ressuspensos em 300 µL de PBS. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina a 10% (Sigma Chem. Co., EUA). O esquema do processo de fracionamento está representado na **Figura 1**.

3.6 Análise do perfil eletroforético do extrato salino e das frações antigênicas

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

Para a realização da análise do perfil proteico do ES e das frações antigênicas (FD e FA), foi utilizada a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE (poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). Foram submetidas à SDS-PAGE 12% as amostras e o padrão de peso molecular, em condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

Um suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical (SE300miniVE, EUA) foi utilizado para o preparo do gel. O gel de separação foi preparado utilizando Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 (Vetec); SDS (dodecil sulfato de sódio, Pharmacia, NJ, EUA) a 0,1%; EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético, Gibco-Brl, EUA) a 2 mM; solução de acrilamida (Pharmacia, EUA) a 30%; bisacrilamida (N, N'-metileno-bis-acrilamida, Sigma Chem. Co., EUA) a 0,8%; água destilada; TEMED (N, N, N, N-tetrametil-amonometano, Sigma Chem. Co., EUA) a 0,125% e APS (persulfato de amônio, Vetec, Brasil) a 0,125%. Para o preparo do gel de empilhamento foram utilizados Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%; EDTA a 2mM; solução de acrilamida a 29% e bisacrilamida a 1%; água destilada; TEMED a 0,125% e APS a 0,125%.

O gel de empilhamento foi depositado sobre o gel de separação no suporte e moldado com o molde de teflon, para formação dos poços. O ES e as frações (FD e FA) foram diluídos em tampão de amostra 10X, e então submetidos à fervura (100°C) por três minutos em banho-maria, antes da aplicação no gel. As placas foram acopladas na cuba contendo tampão de corrida tris-glicina. Uma corrente de 20 mA e voltagem de 300V foram utilizadas para migração dos polipeptídeos por, aproximadamente, uma hora e meia. Como parâmetro para o cálculo dos pesos moleculares relativos das bandas proteicas presentes nas amostras foi utilizado o padrão de peso molecular (Benchmark protein ladder, Novex life Technologies, Invitrogen).

O gel foi corado com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982), com modificações, e foi digitalizado em *scanner* para documentação. A análise da imagem das bandas proteicas obtidas foi realizada utilizando o software *ImageJ*.

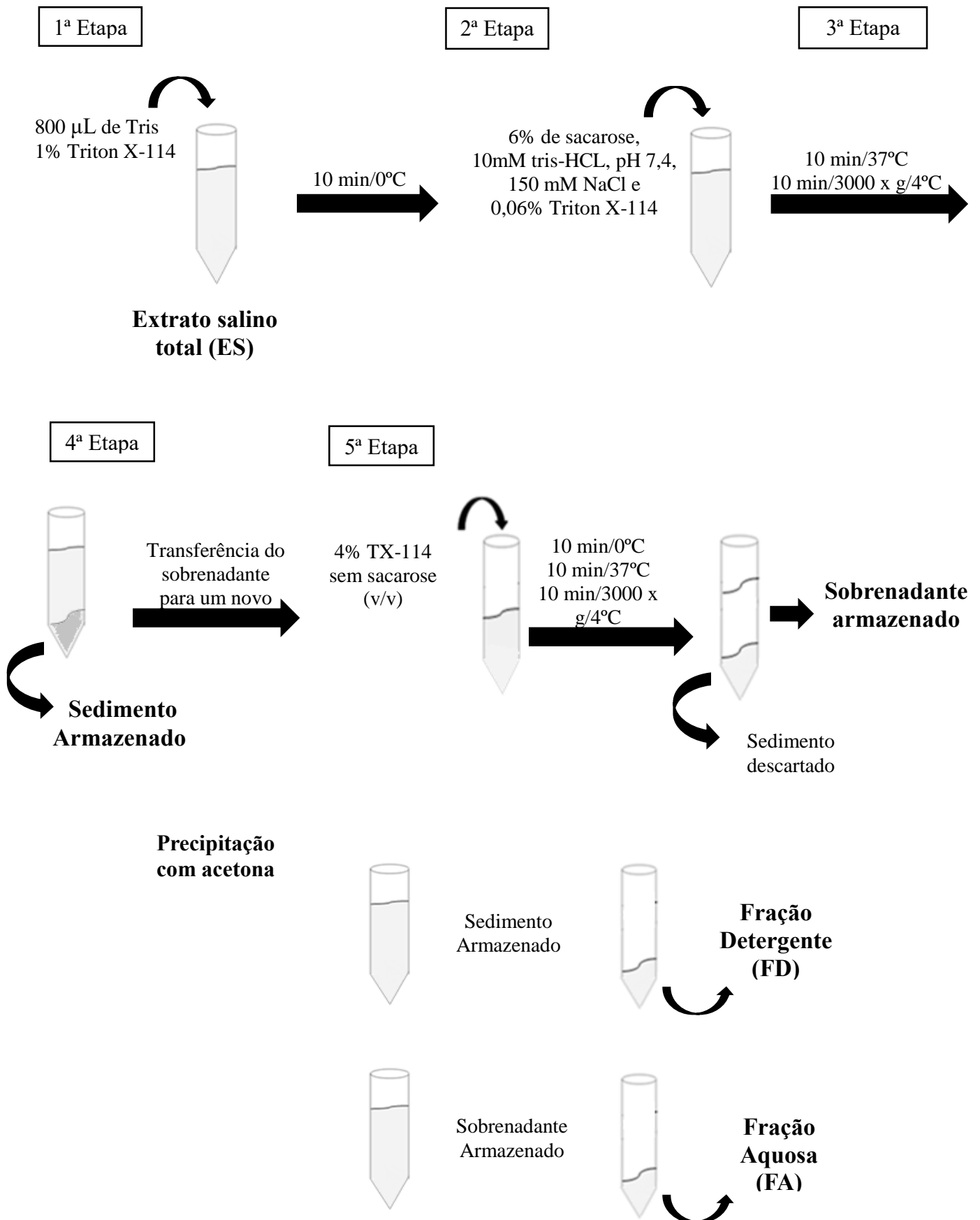


Figura 1. Processo de fracionamento do extrato salino de metacéstódeos de *T. crassiceps* através de Triton X-114.

3.7 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *Taenia* sp.

O teste ELISA foi utilizado para detecção de anticorpos IgG circulantes nas amostras de LCR. Experimentos preliminares foram realizados para determinar condições ótimas para o teste em bloco, através das diluições dos antígenos, do conjugado e das amostras de LCR, além da concentração dos antígenos utilizados. Foram utilizadas como suporte para a adsorção do extrato salino de *T. crassiceps* e das frações (FD e FA) microplacas de poliestireno de baixa afinidade (Greiner, Alemanha). A adsorção dos antígenos foi realizada na concentração de 5 µg/mL a um volume final de 50 µL/poço em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, as placas foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, cinco minutos cada, com PBS acrescido de Tween 20 (PBS-T) a 0,05%. As amostras de LCR testadas na diluição 1:5 em PBS-T, foram dispostas (50 µL/poço) e incubadas por 45 minutos, 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, EUA) na diluição 1:2000 (50 µL/poço). A reação foi incubada por 45 minutos a 37°C. Após novo processo de lavagem a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do substrato H₂O₂ diluído em solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD), preparado no momento de uso (0,005 g de OPD + 12,5 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5 µL de H₂O₂ 30%). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida, com a adição de 25 µL de solução 2 N de H₂SO₄. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (Termo Plate, TP reader).

Os resultados da reatividade das amostras de LCR foram expressos em índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula $IE = (\text{valores de absorbância das amostras} / \text{valor do cut-off})$ para cada extrato antigênico. Amostras com IE >1 foram consideradas positivas.

3.8 Normas de Biossegurança

O procedimento de manipulação das amostras de líquido cefalorraquidiano e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.9 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional com pacotes estatísticos *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, EUA).

Sensibilidade (Se) e especificidade (Es) foram calculadas de acordo com a seguinte fórmula: $Se = a/(a + c)$ e $Es = d/(c + d)$, onde a = verdadeiro positivo, b = falso positivo, c = falso negativo, e d = verdadeiro negativo e expressos como porcentagem (YOUDEM, 1950).

O *cut-off* do teste ELISA foi estabelecido pela média dos três padrões negativos (UKONU; EZE, 2011; MIRANDA et al., 2011). O índice ELISA (IE) foi obtido pela média dos três padrões negativos mais 3 desvios padrão. Para distinção entre amostras positivas e negativas, o índice ELISA foi considerado maior que um ($IE > 1$) para cada preparação antigênica.

Correlações entre os níveis de IgG detectados foram realizadas de acordo com o coeficiente de Spearman (r_s) ($p < 0,0001$). O teste de Friedman foi utilizado para comparação entre as preparações antigênicas, seguido do teste de Comparação Múltipla de Dunn ($p < 0,05$). Para confirmação e validação dos testes diagnósticos, valores preditivos (VPP) e negativo (VPN) foram calculados de acordo com Sopelete (2005).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das três preparações antigênicas de *Taenia crassiceps*

Proteínas do ES foram utilizadas para o processo de fracionamento através TX-114, partindo de uma concentração de 4.068 µg/mL. As frações apresentaram concentrações de: FD - 801 µg/mL e FA - 1173 µg/mL.

Após a extração de TX-114 a partir do ES no imunodiagnóstico da NCC ativa e inativa, a distinção das frações FD e FA foi realizada pelo SDS-PAGE 12% seguido pela coração por nitrato de prata, que possibilitou a identificação de 14 regiões proteicas (15, 17, 18, 20, 23, 25, 27, 37, 50, 70, 90, 120, 147 e 220 kDa), das quais apenas cinco foram equivalentes em ambas as frações (15, 17, 37, 70 e 120 kDa). O ES apresentou bandas proteicas com peso molecular aparente de <10, 12, 15, 20, 30, 50 e 220 kDa. A fração FD apresentou bandas nas regiões de 18, 23, 27, 50 e 220 kDa; e na FA foram identificadas bandas de 20, 25, 90 e 147 kDa. Os dados são apresentados na **Figura 2**.

4.2 Verificação do potencial diagnóstico das frações obtidas no teste ELISA com amostras de LCR

Todas as amostras de LCR foram testadas por ELISA utilizando as três preparações antigênicas (ES, FD e FA).

Os níveis de IgG anti-*Taenia* sp. determinados pelo ELISA utilizando o extrato total de *T. crassiceps* e suas frações FD e FA para o diagnóstico da NCC ativa e inativa estão demonstrados na **Figura 3**.

Precisamente, 97,5% dos pacientes do Grupo 1 foram positivos no ES (20/20, NCC ativa; 19/20, NCC inativa), 100% para FD e para FA (20/20, NCC ativa e inativa). Todas as amostras do Grupo 2 permaneceram negativas quando utilizadas as frações antigênicas (FD e FA) (40/40). Porém, quando utilizado o ES, a positividade alcançou 7,5% (3/40).

Correlações entre os níveis de IgG detectados pelas preparações antigênicas no Grupo 1 foram realizadas, de acordo com o coeficiente de Spearman (r_s) ($p < 0,0001$). A análise demonstrou correlação positiva entre o ES e suas frações (FD e FA). Na detecção de IgG da NCC ativa, FD e FA apresentaram 100% (20/20) dos pacientes duplo positivos, enquanto para a NCC inativa, a correlação correspondeu a 95% (19/20) das amostras. Em ambas as formas de NCC, a correlação entre as frações foi de 100% para a detecção de IgG (**Figura 4**).

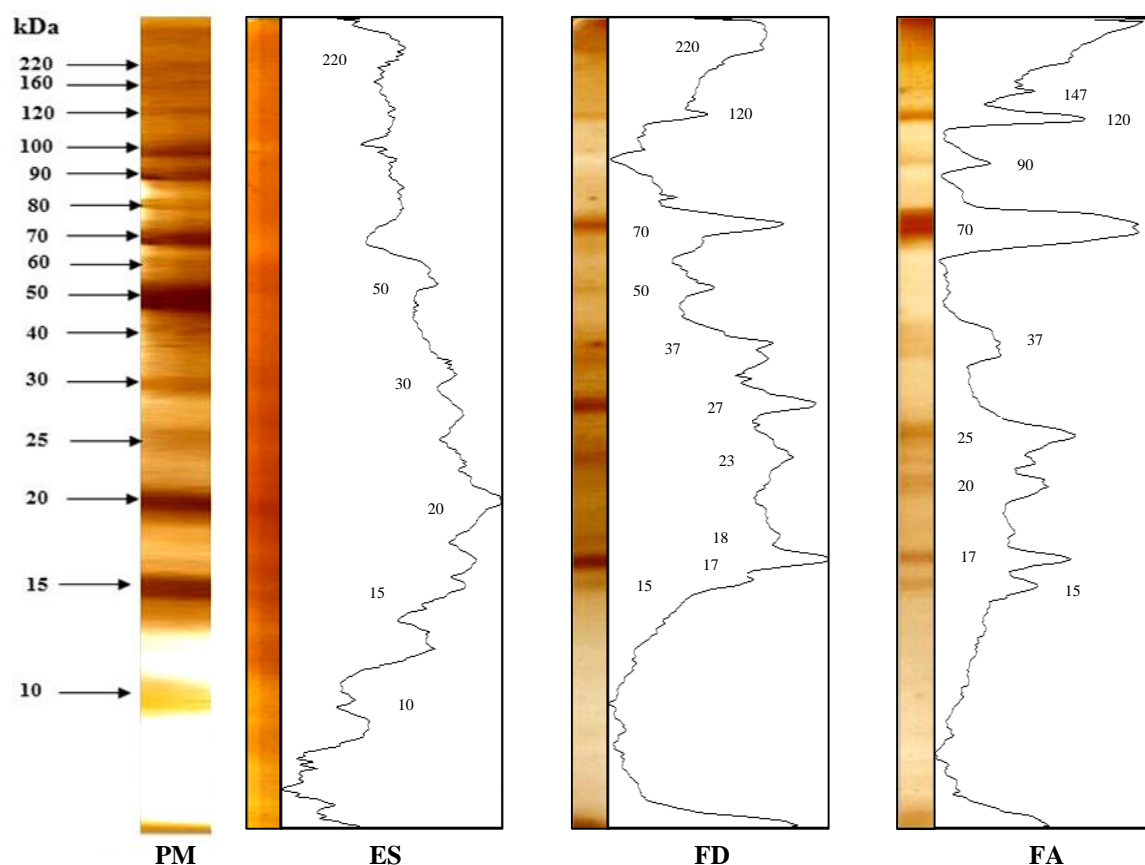


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato salino total (ES) de metacéstódeos de *T. crassiceps* e suas respectivas frações obtidas por TX-114, fração detergente de metacéstódeos de *T. crassiceps* (FD) e fração aquosa de metacéstódeos de *T. crassiceps* (FA). Padrão de peso molecular (PM) demonstrado à esquerda. kDa = kiloDalton.

Para comparação entre as preparações antigênicas, foi utilizado o teste de Friedman, seguido do teste de Comparação Múltipla de Dunn. Em ambos os grupos houve diferença estatística quando comparado ES com FD ou FA (Grupo 1 – NCC ativa: $F = 24,76$, $p < 0,0001$ e NCC inativa: $F = 19,39$, $p < 0,0001$; Grupo 2: $F = 43,83$, $p < 0,0001$). No entanto quando foram comparadas as duas frações (FD e FA), não houve diferença estatística ($p > 0,05$) (no Grupo 2, os resultados se aplicam no diagnóstico da NCC ativa e inativa).

Em relação aos parâmetros de diagnóstico, as frações FD e FA demonstraram melhor sensibilidade e especificidade (Se e $Es = 100\%$) no ELISA no diagnóstico da NCC ativa e inativa quando comparadas com ES, que demonstrou ser menos sensível no diagnóstico da NCC inativa ($Se = 95\%$), apresentando a mesma especificidade para ambos os diagnósticos (NCC ativa e inativa/ $Es = 93\%$). Para confirmação e validação dos testes diagnósticos, valores preditivos positivo e negativo foram calculados. Dados referentes aos parâmetros de diagnóstico estão demonstrados na **Tabela 1**.

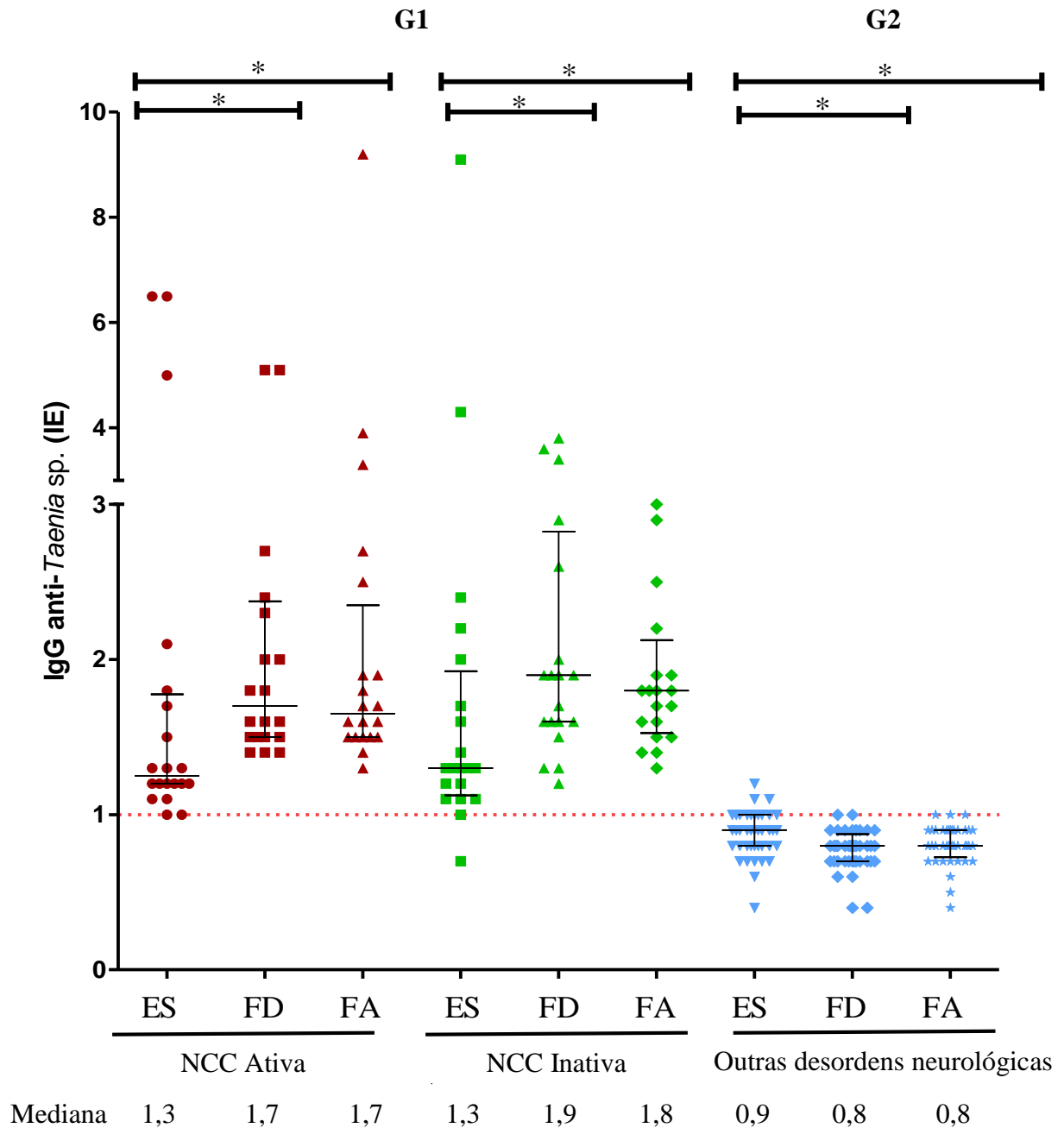


Figura 3. Detecção de IgG anti-*Taenia* sp. por ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) em amostras de líquido de pacientes com neurocisticercose (NCC) ativa ($n = 20$) e inativa ($n = 20$) (G1, $n = 40$) e com outras desordens neurológicas (G2, $n = 40$), por *T. crassiceps* e suas frações detergente (FD) e aquosa (FA) obtidas após fracionamento com TX-114. A linha horizontal indica o *cut-off*, isto é, índice ELISA (IE) >1 . Segmento de reta na mediana e *whiskers* (ou dispersão dos dados) representam intervalo interquartil. * $p < 0,05$.

G1

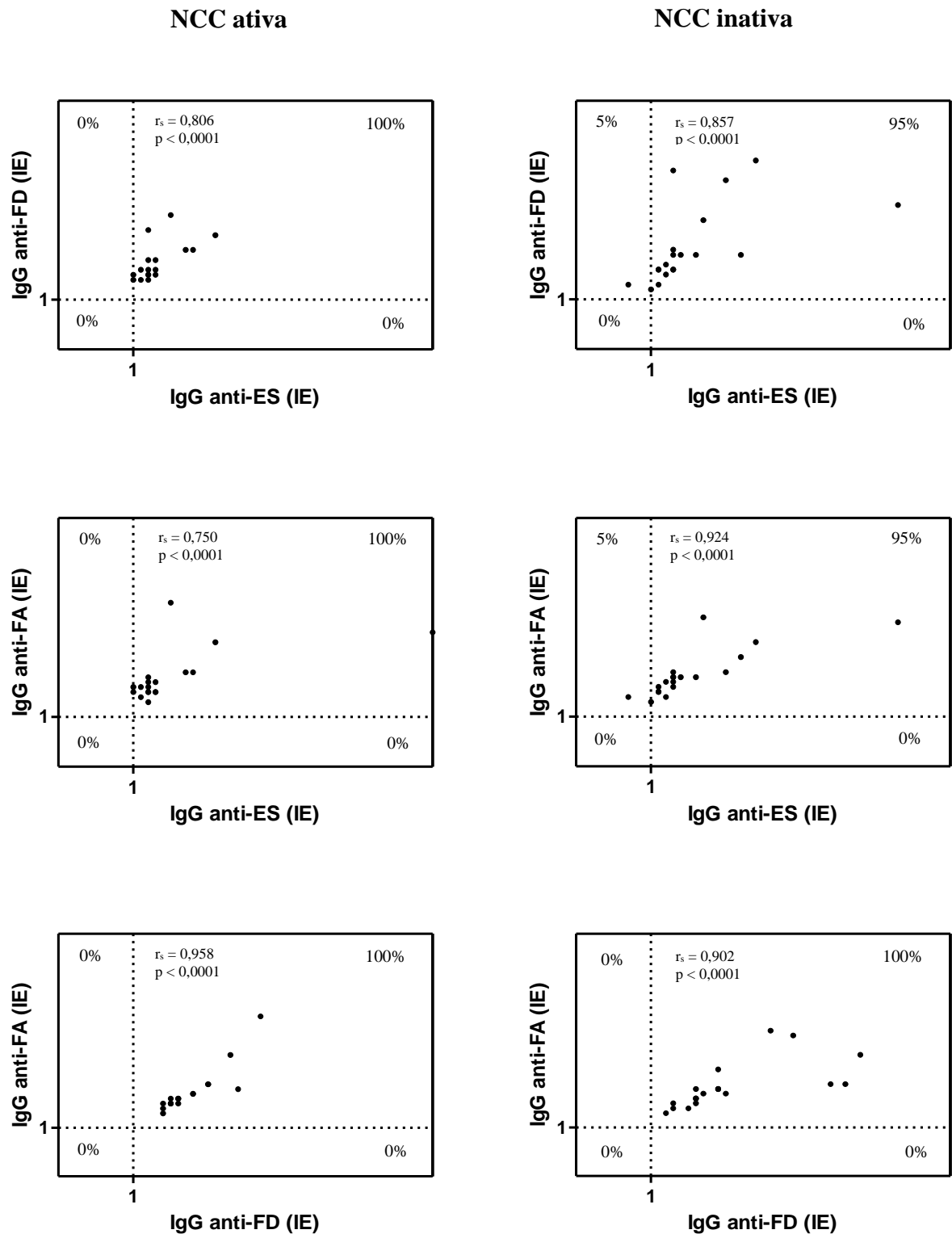


Figura 4. Correlação entre os níveis de IgG anti-*Taenia* sp. em amostras de líquido de pacientes com neurocisticercose (NCC) ativa ($n = 20$) e inativa ($n = 20$) (G1, $n = 40$), por *T. crassiceps* e suas frações detergente (FD) e aquosa (FA) obtidas após fracionamento com TX-114. A linha pontilhada horizontal indica o *cut-off*, isto é, índice ELISA (IE) >1 . Coeficiente de correlação de Spearman (r_s).

Tabela 1. Parâmetros diagnóstico das preparações antigênicas analisadas por ELISA utilizados na detecção de IgG da neurocisticercose ativa e inativa

Preparados antigênicos	ES	FD	FA
NCC	ativa/inativa	ativa/inativa	ativa/inativa
Se (%)	100/95	100/100	100/100
Es (%)	93/93	100/100	100/100
VPP (%)	87/87	100/100	100/100
VPN (%)	100/97,5	100/100	100/100

Se (Sensibilidade), Es (Especificidade), VPP (valor preditivo positivo), VPN (valor preditivo negativo), ES (Extrato salino total), FD (fração detergente) e FA (fração aquosa).

5. DISCUSSÃO

A NCC é uma zoonose reemergente em todo o mundo, e é a principal causa de crises epiléticas no mundo, tornando-se um problema de saúde pública na maioria dos países em desenvolvimento, incluindo a Índia e países da América Latina (MARTINS-MELO et al., 2016).

Devido à dificuldade na obtenção de antígenos homólogos, a partir de suínos infectados naturalmente, para utilização em técnicas de imunodiagnóstico da NCC humana, a identificação e caracterização de antígenos heterólogos é importante para o desenvolvimento de testes altamente específicos e sensíveis. Devido à possibilidade da manutenção de *T. crassiceps*, a espécie tem potencial utilização como antígeno heterólogo para o diagnóstico da NCC humana. A caracterização de suas frações proteicas por métodos químicos pode melhorar esse potencial.

No presente trabalho a solução TX-114, um surfactante não iônico, foi utilizada para separar as fases detergente (hidrofóbica) e aquosa (hidrofílica). O fracionamento antigênico com detergentes é um procedimento rápido e fácil, que não necessita de equipamento especializado, além disso, apresenta uma alta eficiência (BRICKER et al., 2001) e pode gerar frações aplicáveis no diagnóstico da NCC.

O fracionamento do ES de *T. crassiceps* com detergente TX-114 é inédito, e diversos estudos têm aplicado TX-114 na identificação, caracterização e recuperação de proteínas antigênicas de outros parasitos, tais como: *Toxoplasma gondii* (HSIAO et al., 2013), *Trypanosoma cruzi* (CORDERO et al., 2009), *Plasmodium falciparum* (PEREIRA et al., 2015), *Eimeria maxima* (BELLI et al., 2002), *Ancylostoma caninum* (SCHNIEDER et al., 1996), *Schistosoma mansoni* (BICKLE; OLDRIDGE, 1999), *Strongyloides venezuelensis* (FELICIANO et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010b), *Taenia solium* (MACHADO et al., 2007) e *Taenia saginata* (GONÇALVES et al., 2010).

As frações FD e FA apresentaram maior especificidade quando comparadas com ES. Não houve nenhum resultado falso-negativo ou falso-positivo quando utilizadas as frações FD e FA no diagnóstico da NCC ativa e inativa. No entanto, quando utilizado o ES, houve um resultado falso-negativo (1/20) no diagnóstico da NCC inativa, que pode ser explicado pelo baixo título de anticorpos presentes na amostra, visto que todas as amostras utilizadas apresentaram diagnóstico positivo para NCC de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (1996). Foi também observado para o ES três resultados falso-positivos (3/40) no diagnóstico da NCC ativa e inativa, explicado pela semelhança antigênica com outros microrganismos, demonstrando mais uma vez a importância da utilização de frações. O

fracionamento purifica a amostra, que torna-se mais específica no diagnóstico e evita a reatividade cruzada, mas apresenta como desvantagem a grande perda de massa proteica.

Em um estudo desenvolvido por BARCELOS et al. (2001), o teste ELISA foi realizado utilizando antígeno heterólogo total de *T. crassiceps* e amostras de LCR, e apresentou sensibilidade de 85% e especificidade de 100%, quando utilizado o extrato total. Neste estudo, porém, a sensibilidade foi maior quando utilizado o extrato total, mas demonstrou uma menor especificidade no diagnóstico da NCC ativa e inativa.

Outro estudo realizado por BARCELOS et al. (2005) demonstrou que a detecção de IgG em amostras de LCR a partir do extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps* é maior na NCC ativa (80%) do que na inativa (0%), diferentemente do presente estudo, que apresentou 100% e 95% de sensibilidade, respectivamente, quando utilizado o extrato salino total.

Quando comparamos este estudo (Grupo 1) com o realizado por MACHADO et al. (2007), que utilizou o antígeno homólogo (*T. solium*), neste último a detecção de positivos foi maior quando utilizados extrato bruto e fração detergente, o que difere do presente trabalho, que detectou mais pacientes positivos (100%) quando utilizada as frações FD e FA. Em relação do Grupo 2, o presente estudo apresentou falsos-positivos apenas quando utilizado o ES, diferente do trabalho de MACHADO et al. (2007), que apresentou 40% de positivos no grupo de pacientes aparentemente saudáveis quando utilizada a fração aquosa, apresentando especificidade de 84,5% para o extrato total, 93,3% para a fração detergente e 72,6% para a fração aquosa.

No trabalho realizado por GONÇALVES et al. (2010), utilizando *T. saginata* como antígeno heterólogo, houve diferença estatística entre o extrato salino total e a fração aquosa, e entre as frações detergente e aquosa, apresentando especificidade de 73,3% para o extrato total, 82,6% para a fração detergente e 61,3% para a fração aquosa, diferentemente do presente estudo, que apresentou diferenças estatísticas apenas quando comparado o ES com FD e FA, com especificidade de 93% para ES e 100% para FD e FA no diagnóstico da NCC ativa e inativa.

O estudo desenvolvido por FELICIANO et al. (2010), que utilizou frações de *Strongyloides venezuelensis*, demonstrou que a fração detergente apresenta melhor desempenho diagnóstico (Se e Es = 95%), enquanto que no presente estudo ambas as frações FD e FA apresentaram bom desempenho.

Estas diferenças ocorrem devido a mudança de gênero, espécie, tipo de amostras e antígenos utilizados (purificados, de membrana, fluido de vesícula), uma vez que no presente estudo foram utilizadas amostras de LCR, espécie *T. crassiceps*, extrato total e frações

detergente e aquosa, enquanto que nos estudos citados (MACHADO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010 e FELICIANO et al., 2010), foram utilizadas amostras de soro e a espécie *T. solium*, *T. saginata* e *Strongyloides venezuelensis*, o que pode influenciar nos resultados. Em relação aos estudos realizados por BARCELOS et al. (2001) e BARCELOS et al. (2005), apesar da utilização da mesma espécie (*T. crassiceps*) e mesmo tipo de amostra (LCR), houve diferença na sensibilidade e especificidade dos testes e na detecção de IgG, respectivamente, que pode ocorrer, uma vez que as amostras utilizadas diferem quanto aos pacientes, podendo algumas apresentarem maiores títulos de anticorpos do que outras.

A sensibilidade e especificidade da FD foram semelhantes aos valores relatados por outros autores (PARDINI et al., 2002; PERALTA et al., 2002; HANCOCK et al., 2006), que utilizaram técnicas de purificação do antígeno homólogo e heterólogo para o diagnóstico da NCC. ELISA é um teste de triagem e requer um teste para confirmar qual a melhor fração para o diagnóstico da NCC humana.

6. CONCLUSÕES

- O fracionamento do extrato salino de metacestódeos de *T. crassiceps* por hidrofobicidade foi realizado com sucesso, e suas respectivas frações detergente e aquosa foram caracterizadas por SDS-PAGE;
- Ambas frações (hidrofóbica e hidrofílica) obtidas do extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps* podem ser utilizadas com sucesso no imunodiagnóstico da NCC humana ativa e inativa pelo teste ELISA, como antígenos heterólogos;
- Embora as frações tenham demonstrado boa performance diagnóstica no teste ELISA, a realização de um teste confirmatório (*Immunoblotting*) é necessária para determinar qual a melhor fração para o diagnóstico da NCC humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AMARAL, L.; MASCHIETTO, M.; MASCHIETTO R.; CURY, R.; FERREIRA, N. F.; MENDONÇA, R.; LIMA, S. S. Unusual manifestations of neurocysticercosis in MR imaging: analysis of 172 cases. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p. 533-541, 2003.

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

AYALA-SULCA, E.; MIRANDA-ULLOA, E. Evaluation of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot test using purified native antigen mix from cisticercus fluid of *Taenia solium* for diagnosis of human cysticercosis. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 32, p. 485-491, 2015.

BARCELOS, I. S.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of the paired samples (cerebrospinal fluid and serum) in immunodiagnostic of active and inactive human neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 427-429, 2005.

BARCELOS, I. S.; 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 Internacional Health**, v. 6, p. 219-226, 2001.

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.

BASSI, G. E.; ISHIKI, D. K.; FERREIRA, A. W.; CAMARGO, M. E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquiano – considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 27, p. 49-52, 1991.

BELLI, S. I.; LEE, M.; THEBO, P.; WALLACH, M. G.; SCHWARTSBURD, B.; SMITH, N. C. Biochemical characterisation of the 56 and 82 kDa immunodominant gametocyte antigens from *Eimeria maxima*. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 805-816, 2002.

BICKLE, Q. D.; OLDRIDGE, J. Characterization of a stage-specific Mr16000 schistosomular surface glycoprotein antigen of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, p. 85-94, 1999.

BOBES, R. J.; HERNÁNDEZ, M.; MÁRQUEZ, C.; FRAGOSO, G.; GARCÍA, E.; PARKHOUSE, R. M. E.; HARRISON, L. J. S.; SCIUTTO, E.; FLEURY, A. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. **Tropical Medicine & International Health**, v. 11, p. 943-950, 2006.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 1604-1607, 1981.

BOUTEILLE, B. Epidemiology of cysticercosis and neurocysticercosis. **Médecine et Santé Tropicales**, v. 24, p. 367-74, 2014.

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

BRICKER, T. M.; PREVOST, M.; VU, V.; LABORDE, S.; WOMACK, J.; FRANKEL, L. K. Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1503, p. 350-356, 2001.

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.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. D.; LIVRAMENTO, J. A. 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, 2000a.

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

BUENO, E. C.; SNEGE, M.; VAZ, A. J.; LESER, P. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 1140-1144, 2001.

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

CARABIN, H.; NDIMUBANZI, P. C.; BUDKE, C. M.; NGUYEN, H.; QIAN, Y.; COWAN, L. D.; STONER, J. A.; RAINWATER, E.; DICKEY, M. Clinical manifestations associated with neurocysticercosis: a systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 1-13, 2011.

CARDONA, A. E.; RESTREPO, B. I.; JARAMILLO, J. M.; TEALE, J. M. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 995-1002, 1999.

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

COLLÉN, A.; PERSSON, J.; LINDER, M.; NAKARI-SETATA, T.; PENTTILA, M.; TJERNELD, F.; SIVARS, U. IF. A novel two-step extraction method with detergent/polymer systems for primary recovery of the fusion protein endonuclease I-hydrophobin I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1569, p. 139-150, 2002.

CORDERO, E. M.; NAKAYASU, E. S.; GENTIL, L. G.; YOSHIDA, N.; ALMEIDA, I. C.; SILVEIRA, J. F. DA. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 3642-3652, 2009.

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.

COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M.; CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 337-341, 1982.

DA SILVA, A. V. M.; TAKAYANAGUI, O. M. Teníase e cisticercose – *In*: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana** 12^a ed. Atheneu, São Paulo, p. 245-255, 2011.

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

DEGIORGIO, C.; PIETSCH-ESCUETA, S.; TSANG, V.; CORRAL-LEYVA, G.; NG, L.; MEDINA, M. T.; ASTUDILLO, S.; PADILLA, N.; LEYVA, P.; MARTINEZ, L.; NOH, J.; LEVINE, M.; DEL VILLASENOR, R.; SORVILLO, F. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 111, p. 84-88, 2005

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: a review. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis. **The Neurohospitalist**, v. 4, p. 205-212, 2014.

DEL BRUTTO, O. H.; DEL BRUTTO, V. J. Intracellular cysticercosis: a systematic review. **Acta Neurologica Belgica**, v. 113, p. 225-227, 2013.

DEL BRUTTO, O. H.; ENGEL Jr.; ELIASHIV, D. S.; GARCÍA, H. H. Update on cysticercosis epileptogenesis: the role of the hippocampus. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 16, p. 1-7, 2016.

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

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

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.

ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A. H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O. M.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; MAIA, A. A. M.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3178-3184, 2005.

FANKHAUSER, R.; HORNING, B.; WAECHLI, P. *Cysticercus longicollis* in the brain of a field mouse (*Microtus arvalis*). **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 109, p. 525-532, 1967.

FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; GONÇALVES, A. L. R.; RODRIGUES, R. M.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Hydrophobic fractions from *Strongyloides venezuelensis* for use in the human immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 67, p. 153-161, 2010.

FERRER, E.; SÁNCHEZ, J.; MILANO, A.; ALVAREZ, S.; LA ROSA, R.; LARES, M.; GONZÁLEZ, L. M.; CORTÉZ, M. M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GÁRATE, T. Diagnostic epitope variability within *Taenia solium* 8 kDa antigen family: implications for cysticercosis immunodetection. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 78-85, 2012

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

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

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.

FOGANG, Y. F.; SAVADOGO, A. A.; CAMARA, M.; TOFFA, D. H.; BASSE, A.; SOW, A. D.; MANSOUR, M.; NDIAYE, M. M. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. **International Journal of General Medicine**, v. 8, p. 333-344, 2015.

FREEMAN, R. S.; FALLIS, A. M.; SHEA, M.; MABERLEY, A. L.; WALTERS, J. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). II. The parasite. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, p. 493-495, 1973.

FREITAS, A. A.; MOURA, V. B.; GONÇALVES, S. F.; RODRIGUES, A. A.; FÉLIX, R. M.; SOARES, T. P.; IRUSTA, V. R.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, M. A.; LINO, R. S. Jr. Kinetics of the inflammatory response in subcutaneous cysticercosis induced in mice by *Taenia crassiceps*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, p. 267-274, 2012.

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

GALÁN-PUCHADES, M. T.; FUENTES, M. V. Lights and shadows of the *Taenia asiatica* life cycle and pathogenicity. **Tropical Parasitology**, v. 3, p. 114-119, 2013.

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

GARCIA, H. H.; RODRIGUEZ, S.; FRIEDLAND, J. S. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 388-396, 2014.

GARCIA, H. H.; EVANS, C. A. W.; NASH, T. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; WHITE JR., A. C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V. C. W.; SCHANTZ, P. M.; ALLAN, J. C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J. S.; MARTINEZ, S. M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; DEL BRUTTO, O. H. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 747-756, 2002.

GARCÍA-MONTOYA, G. M.; MESA-ARANGO, J. A.; ISAZA-AGUDELO, J. P.; AGUDELO-LOPEZ, S. P.; CABARCAS, F.; BARRERA, L. F.; ALZATE, J. F. Transcriptome profiling of the cysticercus stage of the laboratory model *Taenia crassiceps*, strain ORF. **Acta Tropica**, v. 154, p. 50-62, 2016.

GARG, R. K. Diagnostic criteria for neurocysticercosis: some modifications are needed for Indian patients. **Neurology India**, v. 52, p. 171-177, 2004.

GOMES, A. B.; SOARES, K. A.; BUENO, E. C.; ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A. H.; MAIA, A. A. M.; PERALTA, R. H. S.; VAZ, A. J. Comparative evaluation of different immunoassays for the detection of *Taenia solium* cysticercosis in swine with low parasite burden. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 725-731, 2007.

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.

HAMAMOTO FILHO, P. T.; ZANINI, M. A.; BOTTA, F. P.; RODRIGUES, M. V.; BAZAN, R.; VULCANO, L. C.; BIONDI, G. F. Development of an experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus. Pilot study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, p. 819-823, 2015.

HANCOCK, K.; PATTANHI, S.; WHITFIELD, F. W.; YUSHAK, M. L.; LANE, W. S.; GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 147, p. 109-117, 2006.

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.

HOBERG, E. P.; JONES, A.; RAUSCH, R. L.; EOM, K. S.; GARDNER, S. L. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 89-98, 2000.

HSIAO, CH. C.; HILLER, N. L.; HALDAR, K.; KNOLL, L. J. A HT/PEXEL motif in *Toxoplasma* dense granule proteins is a signal for protein cleavage but not export into the host cell. **Traffic**, v. 14, p. 519-531, 2013.

ISHIDA, M. M. I.; ALMEIDA, M. S. S.; ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A.; PEREIRA, D. A.; SOUZA, J. G.; VARVAKIS, T. R.; VAZ, A. J. Seroepidemiological study of human cysticercosis with blood samples collected on filter paper, in Lages, State of Santa Catarina, Brazil, 2004-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 339-343, 2011.

JOHN, C. C.; CARABIN, H.; MONTANO, S. M.; BANGIRANA, P.; ZUNT, J. R.; PETERSON, P. K. Global research priorities for infections that affect the nervous system. **Nature**, v. 527, p. 178-186, 2015.

KELVIN, E. A.; CARPIO, A.; BAGIELLA, E.; LESLIE, D.; LEON, P.; ANDREWS, H.; HAUSER, W. A. Seizure in people with newly diagnosed active or transitional neurocysticercosis. **Seizure**, v. 20, p. 119-125, 2011.

KIM, S. K.; WANG, K. C.; PAEK, S. H.; HONG, K. S.; CHO, B. K. Outcomes of medical treatment of neurocysticercosis: a study of 65 cases in Cheju Island, Korea. **Surgical Neurology**, v. 52, p. 563-569, 1999.

KRAFT, R. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. **American Family Physician**, v. 76, p. 91-96, 2007.

KUMAR, G. R. Diagnostic criteria for neurocysticercosis: some modifications are needed for Indian patients. **Neurology India**, v. 52, p. 171-177, 2004.

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.; MONTROYA, 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.

LESCANO, A. G.; ZUNT, J. Other cestodes: sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 335-345, 2013.

MACHADO, G. A.; OLIVEIRA, H. B.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Serodiagnosis of human neurocysticercosis using antigenic components of *Taenia solium* metacestodes derived from the unbound fraction from jacalin affinity chromatography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 368-375, 2013.

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.

MALLA, N.; KAUR, R.; GANGULY, N. K.; SAWHNEY, I. M.; MAHAJAN, R. C. Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. **Nepal Medical College Journal**, v. 7, p. 1-9, 2005.

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.

MANZOORI, J. L.; BAVILI-TABRIZI, A. Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 470, p. 215-221, 2002.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS-JUNIOR, A. N.; CAVALCANTI, M. G.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Neurocysticercosis - related mortality in Brazil, 2000-2011: epidemiology of a neglected neurologic cause of death. **Acta Tropica**, v. 153, p. 128-136, 2016.

MATOS-SILVA, H.; RECIPUTTI, B. P.; DE PAULA, E. C.; OLIVEIRA, A. L.; MOURA, V. B. L.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; LINO-JÚNIOR, R. S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 70, p. 287-292, 2012.

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.

MEGUINS, L. C.; ADRY, R. A.; SILVA, S. C. Jr.; PEREIRA, C. U.; OLIVEIRA, J. G.; MORAIS, D. F.; ARAÚJO FILHO, G. M.; MARQUES, L. H. Longer epilepsy duration and multiple lobe involvement predict worse seizure outcome for patients with refractory temporal lobe epilepsy associated with neurocysticercosis. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 73, p. 1014-1018, 2015.

MENDLOVIC, F.; GARZA-RODRÍGUEZ, A.; CARRILO-FARGA, J.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, F.; MARAVILLA, P.; FLISSER, A. From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. **Parasites & Vectors**, v. 16, p. 7-12, 2014.

MEWARA, A.; GOYAL, K.; SEHGAL, R. Neurocysticercosis: A disease of neglect. **Tropical Parasitology**, v. 3, p. 106-113, 2013.

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.

MINEO, J. R. Biossegurança. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. de O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área Biomédica: do planejamento a publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. p. 81-111.

MIRANDA, D. O.; SILVA, D. A. O.; FERNANDES, J. F. C.; QUEIRÓS, M. G. J.; CHIBA, H. F.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; PENA, J. D. O.; SUNG, SS. J.; SEGUNDO, G. R. S.; TAKETOMI, E. A. Serum and salivary IgE, IgA, and IgG₄ antibodies to *Dermatophagoides pteronyssinus* and its major allergens, Der p1 and Der p2, in allergic and nonallergic children. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, p. 1-11, 2011.

MOURA, V. B. L.; LIMA, S. B.; MATOS-SILVA, H.; VINAUD, M. C.; LOYOLA, P. R. A. N.; LINOJR, R. S. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 2, p. 1-9, 2015.

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

NAVARRETE-PEREA, J.; OROZCO-RAMÍREZ, R.; MOQUEL, B.; SCIUTTO, E.; BOBES, R. J.; LACLETTE, J. P. Differential antigenic protein recovery from *Taenia solium* cyst tissues using several detergents. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 202, p. 22-28, 2015.

NORTHERN, C.; GROVE, D. I.; WARTON, A.; LOVEGROVE, F. T. Surface labelling of *Strongyloides ratti*: stage-specificity and cross-reactivity with *S. stercoralis*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 75, p. 487-92, 1989.

NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; DA CUNHA, J. P. JR; COSTA-CRUZ, J. M. *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**, v. 76, p. 36-41, 2013.

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.; 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.

O'NEAL, S. E.; FLECKER, R. H. Hospitalization frequency and charges for neurocysticercosis, United States, 2003-2012. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, p. 969-976, 2015.

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.

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.

PERALTA, R. H. S.; VAZ, A. J.; PARDINI, A.; MACEDO, H. W.; MACHADO, L. R.; DE SIMONE, S. G.; PERALTA, J. M. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 83, p. 159-168, 2002.

PEREIRA, Y. D.; CHIU, R. Y. T.; ZHANG, S. C. L.; WU, B. M.; KAMEI, D. T. Single-step, paper-based concentration and detection of a malaria biomarker. **Analytica Chimica Acta**, v. 882, p. 83-89, 2015.

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

RAJKOTIA, Y.; LESCANO, A. G.; GILMAN, R. H.; CORNEJO, C.; GARCIA, H. H. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 101, p. 840-846, 2007.

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

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

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, 2010a.

RIBEIRO, V. S.; FELICIANO, N. D.; GONZAGA, H. T.; COSTA, I. N.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Detergent fraction of heterologous antigen to detect IgA and IgG in strongyloidiasis using saliva and serum paired samples. **Immunology Letters**, v. 134, p. 69-74, 2010b.

RIBEIRO, V. S.; NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacestode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2569-2575, 2014.

RIETSCHER, G. Contribution to the knowledge of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda, Taeniidae) (author's transl). **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 65, p. 309-315, 1981.

RON-GARRIDO, L.; CORAL-ALMEIDA, M.; GABRIËL, S.; BENITEZ-ORTIZ, W.; SAEGERMAN, C.; DORNY, P.; BERKVEN, D.; ABATIH, E. N. Distribution and potential indicators of hospitalized cases of neurocysticercosis and epilepsy in Ecuador from 1996 to 2008. **Plos Neglected Diseases and Tropical**, v. 9, p. 1-21, 2015.

SAHU, P. S.; SEEPANA, J.; PADELA, S.; SAHU, A. K.; SUBBARAYUDU, S.; BARUA, A. Neurocysticercosis in children presenting with afebrile seizure: clinical profile, imaging and serodiagnosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 253-258, 2014.

SAKO, Y.; ITOH, S.; OKAMOTO, M.; NAKAYA, K.; ITO, A. Simple and reliable preparation of immunodiagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis. **Parasitology**, v. 140, p. 1589-1594, 2013.

SAKO, Y.; TAKAYANAGUI, O. M.; ODASHIMA, N. S.; ITO, A. Comparative study of paired serum and cerebrospinal fluid samples from neurocysticercosis patients for the detection of specific antibody to *Taenia solium* immunodiagnostic antigen. **Tropical Medicine Health**, v. 43, p. 171-176, 2015.

SANDMAN, M.; BITTENCOURT, P. R. Epilepsy. In: SHAKIR, R. A.; NEWMAN, P. K.; POSER, C. M., editors. **Tropical Neurology**. London: WB Saunders Co LTD; 2002. p. 417-426.

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

SCHARF, D. Neurocysticercosis. Two hundred thirty-eight cases from a California Hospital. **Archives of Neurology**, v. 45, p. 777-780, 1988.

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

SCHNIEDER, T.; KOHLMETZ, C.; EPE, C.; STOYE, M. Immunochemical characterization of *Ancylostoma caninum* antigens. **Applied Parasitology**, v. 37, p. 146-152, 1996.

SHANDERA, W. X.; WHITE, A. C. Jr.; CHEN, J. C.; DIAZ, P.; ARMSTRONG, R. Neurocysticercosis in Houston, Texas. A report of 112 cases. **Medicine (Baltimore)**, v. 73, p. 37-52, 1994.

SHIGUEKAWA, K. Y.; MINEO, J. R.; DE MOURA, L. P.; COSTA-CRUZ, J. M. ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, p. 443-449, 2000.

SIKASUNGE, C. S.; PHIRI, I. K.; PHIRI, A. M.; DORNY, P.; SIZIYA, S.; WILLINGHAM, A. L. III. Risk factors associated with porcine cysticercosis in selected districts of Eastern and Southern provinces of Zambia. **Veterinary Journal**, v. 143, p. 59-66, 2007.

SILVEIRA-LACERDA, E. P.; MACHADO, E. R.; ARANTES, S. C. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 229-331, 2002.

SOBNACH, S.; KHOSA, S. A.; PATHER, S.; LONGHURST, S.; KAHN, D.; RAUBENHEIMER, P. J. First case report of pharyngeal cysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 206-208, 2009.

SOPELETE, M. C. Métodos de análise em estudos sobre diagnóstico. In: MINEO, J. R.; SILVA, D. A. de O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª ed. Uberlândia: EDUFU, 2009. p. 203-222.

SOTELO, J.; MARIN, C. Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. **Journal of Neurosurgery**, v. 66, p. 686–689, 1987.

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

SUZUKI, L. A.; ARRUDA, G. C.; QUAGLIATO, E. M.; ROSSI, Q. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 152-155, 2007.

TAKAYANAGUI, O. M. Neurocisticercose: quadro clínico e diagnóstico tomográfico. **Revista de Patologia Tropical**, v. 23, p. 102-104, 1994a.

TAKAYANAGUI, O. M. Aspectos incomuns no diagnóstico clínico, laboratorial e por imagem da neurocisticercose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p. 483-485, 1994b.

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.

TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; WITTNER, M. Tapeworms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 3, p. 77-84, 2001.

TERRAZAS, L. I. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 383-392, 2008.

THOMAS, L. F.; HARRISON, L. J. S.; TOYE, P.; GLANVILLE, W. A.; COOK, E. A. J.; WAMAE, C. N.; FÈVRE, E. M. Prevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs entering the food chain in western Kenya. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 233-238, 2016.

TOGORO, S. Y.; SOUZA, E. M. de; SATO, N. S. Diagnóstico laboratorial da neurocisticercose: revisão e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 345-355, 2012.

TREVISAN, C.; DEVLEESSCHAUWER, B.; SCHMIDT, V.; WINKLER, A. S.; HARRISON, W.; JOHANSEN, M. V. The societal cost of *Taenia solium* cysticercosis in Tanzania. **Acta Tropica**, v. 3809, p. 1-14, 2015.

TREVISOL-BITTENCOURT, P. C.; SILVA, N. C.; FIGUEREDO, R. Neurocisticercose em pacientes internados por epilepsia no hospital regional de Chapecó, região oeste de Santa Catarina. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, p. 53-58, 1998.

TSCHERPEL, C.; GOTTSCHALK, A.; MEYDING-LAMADÉ, U.; FINK, G. R.; BURGHHAUS, L. Neurocysticercosis. **Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie**, v. 83, p. 451-455, 2015.

UKONU, B. A.; EZE, E. U. Prevalence of HHV-8 antibodies among HIV infected patients. **Global Journal of Health Science**, v. 3, p. 185-188, 2011.

VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (Eds.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 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.

VAZ, A. J. Infecções Parasitárias. In: VAZ, A. J.; TAKEI, K.; BUENO, E. C., editors. **Imunoensaios – fundamentos e aplicações: ciências farmacêuticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 188-189.

WILLMS, K.; ZURUBIAN, R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. **Parasitology**, v. 137, p. 335-346, 2010.

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

WHITE, A. C. Jr.; ROBINSON, P.; KUHN, R. *Taenia solium* cysticercosis: Host-parasite interactions and the immune response. **Chemical Immunology**, v. 66, p. 209-230, 1997.

WUNSCHMANN, A.; GARLIE, V.; AVERBECK, G.; KURTZ, H.; HOBERG, E. P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 484-488, 2003.

YOUDEM, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v.3, p. 32-5, 1950.

ANEXO

Critério Diagnóstico para a cisticercose humana – Del Brutto et al., 1996

Critério Absoluto

1. Demonstração histológica do parasito a partir de um nódulo subcutâneo ou lesão cerebral
2. Visualização direta do parasito pela examinação fundoscópica
3. Evidência de lesão cística mostrando o escólex em TC ou RM

Critério Maior

1. Evidência de lesões sugestivas de neurocisticercose em estudos de neuroimagem*
2. Teste imunológico positivo para detecção de anticorpos anti-metacestódeos de *Tania solium***
3. Radiografia simples mostrando múltiplas calcificações em músculos da coxa e da panturrilha

Critério Menor

1. Presença de nódulos subcutâneos (sem confirmação histológica)
2. Evidência de tecidos moles ou calcificações intracranianas pontuadas em radiografias simples
3. Presença de manifestações clínicas sugestivas de neurocisticercose***
4. Desaparecimento de lesões intracranianas após tratamento com drogas anti-metacestódeos de *Taenia solium*

Critério Epidemiológico

1. Indivíduos provenientes de ou que vivem em uma área onde a cisticercose é endêmica
 2. História de viagens frequentes às áreas endêmicas para cisticercose
 3. Evidência de um contato domiciliar com infecção por *T. solium*
-

* TC (tomografia computadorizada) ou RM (ressonância magnética) mostrando lesões císticas, lesões do anel de reforço, calcificações no parênquima cerebral, hidrocefalia e aumento anormal das leptomeninges. Mielograma mostrando múltiplos defeitos de enchimento na coluna do meio de contraste.

** *Immunoblotting* soro e ELISA CSF.

*** Epilepsia, sinais neurológicos focais, hipertensão intracraniana, e demência.

Diagnóstico definitivo para NCC

- Presença de um critério absoluto ou presença de dois critérios maiores ou presença de um critério maior mais dois menores e um epidemiológico.

Diagnóstico provável para NCC

- Presença de um critério maior mais dois menores ou presença de um critério maior mais um menor e um epidemiológico ou presença de três critérios menores mais um epidemiológico.

Diagnóstico possível para NCC

- Presença de um critério maior ou presença de dois critérios menores ou presença de um critério menos mais um epidemiológico.