



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

Flávia de Assunção Gonçalves

Estudo das frações hidrofóbica e hidrofílica de metacestódeos de *Taenia saginata* no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana

Uberlândia – MG
2008



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

Flávia de Assunção Gonçalves

Estudo das frações hidrofóbica e hidrofílica de metacestódeos de *Taenia saginata* no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana

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

Uberlândia – MG
2008



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

Flávia de Assunção Gonçalves

Estudo das frações hidrofóbica e hidrofílica de metacestódeos de *Taenia saginata* no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana

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

Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz
Orientadora

Uberlândia – MG
2008

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Referência Nacional no Diagnóstico de Cisticercose e de Imunoparasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, sob orientação da Profª Drª Julia Maria Costa-Cruz e apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

DEDICO ESPECIALMENTE...

À Deus,

Por me manter forte e saudável e por orientar os meus passos todos os dias.

Aos meus pais,

José Dias Gonçalves e Maria Adélia de Assunção Gonçalves, pelo amor, carinho e por todo apoio, tão imprescindíveis para que esta caminhada terminasse com sucesso.

Ao meu irmão,

Ricardo de Assunção Gonçalves, pelo incentivo constante, amor dispensado a mim, sobretudo pelo exemplo de lutar e nunca desanimar perante os obstáculos.

Aos meus avôs,

Pelo exemplo de simplicidade, amor, honestidade e família.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

À Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, confiança, compreensão, paciência e dedicação durante todo o estudo.

Ao Prof Dr. José Roberto Mineo, por ter permitido a utilização das instalações do Laboratório de Imunoparasitologia e pela colaboração.

À MSc. Gleyce Alves Machado, pela sincera amizade, pela agradável convivência nestes dois anos, pela dedicação e colaboração constante em todas as etapas. Sucesso amiga!

À MSc. Heliana Batista de Oliveira, pela amizade adquirida antes mesmo desta minha caminhada em Uberlândia, pelo incentivo e apoio oferecido nos momentos de dificuldade. Nunca te esquecerei amiga!

*Às MSc. Rosângela Maria Rodrigues e Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, pela oportunidade de participar como colaboradora nos projetos de *Strongyloides stercoralis*, além da amizade consolidada ao longo deste período.*

À amiga Carla Duque Lopes, pelo companheirismo, confiança, amizade incondicional e pela convivência maravilhosa nestes anos em Uberlândia. Sucesso querida!

Às colegas, Marianna Nascimento Manhani e Vanessa da Silva Ribeiro, pelo apoio e amizade.

A todos os professores da Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, verdadeiros mestres que contribuíram na lapidação dos meus conhecimentos e na construção do senso crítico, virtudes importantíssimas àquele que almeja a vida científica.

Aos secretários da Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, João Martins Neto e Lucileide Freitas Queiroz Damásio e ao secretário da ARIMP, Jorge Andrade Rodrigues, pela grandiosa amizade e auxílio em todos os momentos.

Aos funcionários dos Laboratórios de Parasitologia, Maria das Graças, Maria do Rosário, Geraldo, Scheila, Elaine, Rosângela Terezinha, pelos conselhos, carinho e amizade.

À Universidade Pública e gratuita, verdadeiro centro de excelência, oficina do saber, base para uma sociedade igualitária e uma nação desenvolvida, que irriga com o seu conhecimento os áridos terrenos da educação e da ciência no nosso país.

À CAPES, pela concessão de bolsa durante esses dois anos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| A | Aquosa |
| D | Detergente |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DO | Densidade óptica |
| ED | Eficiência de Diagnóstico |
| EDTA | <i>EthyleneDiamineTetrAcetic acid</i> |
| EITB | <i>Enzyme-linked Immunoelctrotransferblot</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FAO | <i>Food and Agriculture Organization</i> |
| Fn | Falso negativo |
| Fp | Falso positivo |
| Grupo 1 | Pacientes com diagnóstico definitivo de NC |
| Grupo 2 | Pacientes infectados por outros parasitos |
| Grupo 3 | Indivíduos aparentemente saudáveis |
| HC-UFU | Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia |
| HPJ | Método de Hoffmann, Pons e Janer |
| IB | <i>Immunoblotting</i> |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL | Interleucina |
| ILRI | <i>International Livestock Research Institute</i> |
| IR | Índice de Reatividade |
| kDa | kilo Daltons |
| LCR | Líquido cefalorraquidiano |
| mg | média geométrica |
| NC | Neurocisticercose |
| OPD | Ortofenilenodiamina |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PBS-T | PBS acrescido de Tween 20 |
| PBS-TM | PBS-T acrescido de leite desnatado |
| RM | Ressonância Magnética |
| S | Extrato salino total |
| SDS-PAGE | <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TC | Tomografia Computadorizada |
| TX-114 | Triton X-114 |
| UFU | Universidade Federal de Uberlândia |
| Vn | Verdadeiro negativo |
| Vp | Verdadeiro positivo |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |
| YI | <i>Youden Index</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 – INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 - Aspectos taxonômicos e morfologia de <i>Taenia</i> sp. | 01 |
| 1.2 - Ciclo Biológico do Complexo Teníase-Cisticercose | 03 |
| 1.3 - Epidemiologia do Complexo Teníase-Cisticercose | 05 |
| 1.4 - Medidas de Controle para o Complexo Teníase-Cisticercose | 11 |
| 1.5 - Resposta Imune e Relação Parasito-Hospedeiro da Cisticercose Humana | 13 |
| 1.6 - Sintomatologia da Cisticercose Humana | 14 |
| 1.7 - Diagnóstico da Cisticercose Humana | 15 |
| 1.8 - Antígenos Alternativos no Diagnóstico da Cisticercose Humana | 17 |
| 1.9 - Extratos Antigênicos Purificados | 19 |
| 1.9.1 - Purificação com Triton X-114 | 19 |
| 2 – OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 - Objetivo geral | 21 |
| 2.2 - Objetivos específicos | 21 |
| 3 – MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 - Aspectos Éticos | 22 |
| 3.2 - Procedência das amostras de soro | 22 |
| 3.2.1 - Amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de neurocisticercose (Grupo 1) | 23 |
| 3.2.2 - Amostras de soro de pacientes infectados por <i>Taenia</i> sp. e por outros parasitos (Grupo 2) | 24 |
| 3.2.3 - Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis (Grupo 3) | 25 |
| 3.3 - Obtenção das formas metacestódeas de <i>T. saginata</i> | 25 |
| 3.4 - Extratos antigênicos | 25 |
| 3.4.1 - Preparo do extrato salino total de metacestódeos de <i>T. saginata</i> | 25 |
| 3.4.2 - Purificação do extrato salino total através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica | 26 |
| 3.5 - Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas em SDS-PAGE 12% | 27 |
| 3.6 - Coloração do Gel por Nitrato de Prata | 28 |
| 3.7 - Testes Imunológicos | 29 |
| 3.7.1 - Teste ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de <i>T. solium</i> | 29 |
| 3.7.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida e <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG | 30 |
| 3.8 - Normas de Biossegurança | 32 |
| 3.9 - Análise Estatística | 32 |
| 4 – RESULTADOS | 34 |
| 4.1 - Dosagem protéica dos extratos antigênicos | 34 |
| 4.2 - SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% | 34 |
| 4.3 - ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> | 34 |
| 4.4 - <i>Immunoblotting</i> para detecção de IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> | 40 |
| 5 – DISCUSSÃO | 46 |
| 6 – CONCLUSÕES | 50 |
| 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

RESUMO

A Neurocisticercose (NC), resultado do acometimento do sistema nervoso central pelas formas metacestódeas de *Taenia solium*, é uma doença polimórfica podendo ser confundida com outras síndromes neurológicas que apresentam achados clínicos e de imagem similares. Uma vez que esta parasitose é endêmica no Brasil o diagnóstico sorológico é de grande importância, pois auxilia na rotina laboratorial de pacientes com suspeita clínica. A busca por antígenos alternativos se faz necessária diante da dificuldade de obtenção de suínos naturalmente infectados com metacestódeos de *T. solium*, para a produção do antígeno homólogo. Uma vez que antígenos purificados apresentam sensibilidade e especificidade superiores aos extratos totais, o objetivo deste estudo foi avaliar os testes *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Immunoblotting* (IB) no diagnóstico sorológico da NC humana utilizando o extrato salino total (S) de metacestódeos de *Taenia saginata* e suas frações purificadas com Triton X-114 (TX-114). Uma alíquota do extrato S foi fracionada com TX-114, para obtenção das frações antigênicas: hidrofóbica ou detergente (D) e hidrofílica ou aquosa (A). Os extratos antigênicos foram analisados em SDS-PAGE 12% e utilizados no ELISA na concentração de 10µg/mL. Foram analisadas 115 amostras de soro: 40 de pacientes com diagnóstico definitivo de NC, 45 de pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos e 30 de indivíduos saudáveis. As amostras foram diluídas a 1:200 para o ELISA, sendo apenas as positivas submetidas ao IB, na diluição de 1:100. A sensibilidade e especificidade do ELISA foram: 95% e 73,3% (S), 95% e 82,6% (D) e 65% e 61,3% (A), respectivamente. O cálculo de eficiência do diagnóstico e *Youden Index* foram: 83,9% e 0,74 (S); 88,5% e 0,80 (D) e 72,8 % e 0,46 (A), respectivamente. No IB a fração D apresentou com exclusividade a banda imunodominante de 70-64 kDa, sendo detectada em 92,5% dos pacientes com NC. A fração D foi significativamente mais eficiente que a fração A, tanto no ELISA quanto no IB, sendo assim, recomendada como antígeno heterólogo purificado no diagnóstico sorológico da NC humana no IB.

Palavras-chaves: Neurocisticercose; *Taenia saginata*; Triton X-114; ELISA; *Immunoblotting*

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NC) caused by the *Taenia solium* metacestodes usually affects the central nervous system and can be confused with other brain pathologies, which present similar clinical and image findings. This parasitose is endemic in Brazil and the serological diagnosis of NC is of great importance in routine clinical management of patients. The search for alternative antigens for NC immunodiagnosis is importance because of the difficulty of obtaining parasites from naturally infected pigs for the preparation of metacestodes *T. solium* homologous antigen. Once that purified antigen is more sensitive and specific than crude saline extracts, the objective of this study was to evaluate the performance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Immunoblotting (IB) for the serological diagnosis of human NC, using the crude saline extract (Crude) obtained from *T. saginata* metacestodes and two fractions of this extract, hydrophobic or detergent fraction (D) and hydrophilic or aqueous fraction (A), purified by extraction with Triton X-114 as alternative purified antigens for the diagnosis of human NC. Serum samples were obtained from 115 individuals: 40 patients with a definitive diagnosis of NC, 45 patients with *Taenia* sp. and with other parasitic diseases and 30 apparently healthy individuals. The serum samples were diluted 1:200 for ELISA but only the samples positives were diluted 1:100 and evaluated in IB. ELISA sensitivity and specificity were 95% and 73.3% when using Crude, 95% and 82.6% for D phase and 65% and 61.3% for A phase, respectively. The diagnostic efficiency and Youden index were: 83.9% and 0.74 (Crude), 88.5% and 0.80 (D phase) and 72.8 % and 0.46 (A phase), respectively. IB of the antigens confirmed the results obtained by ELISA, and the D phase antigen proved to be more specific than other extracts, showing only one immunodominant protein of 70-64 kDa that was the most frequent (92.5%) among patients with NC. Our results suggest that the D phase obtained with Triton X-114 can be used as heterologous purified antigen for the serological diagnosis of human NC in the IB.

Keywords: Neurocysticercosis; *Taenia saginata*; Triton X-114; ELISA; Immunoblotting

1 – INTRODUÇÃO

A cisticercose humana é uma doença causada pelo desenvolvimento da forma larvária de *Taenia solium* nos tecidos e quando a infecção está localizada no sistema nervoso central, é denominada de neurocisticercose (NC). Esta doença atinge milhões de indivíduos, distribuídos na América Latina, Índia, África, leste da Ásia e outros países em desenvolvimento, especialmente aquelas áreas que apresentam urbanização desordenada, condições sanitárias precárias e baixo nível socioeconômico e cultural, e em regiões onde a inspeção de carne não é rigorosa (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; CARPIO, 2002; DEGIORGIO et al., 2004; HAWK et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

1.1 – Aspectos taxonômicos e morfologia de *Taenia* sp.

A teníase é uma parasitose intestinal provocada pela presença da forma adulta de *T. solium* (Linnaeus, 1758) ou de *Taenia saginata* (Goeze, 1782) no intestino delgado do homem. A cisticercose humana é o resultado da presença da forma metacestódea (ou metacestódeo) de *T. Solium* nos tecidos humanos. Estes parasitos pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestodea, Ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae (REY, 2001; HOBERG, 2002).

Em estudos filogenéticos, a origem e a relação entre as espécies *T. solium*, *T. saginata* e *Taenia asiatica* tem demonstrado que *T. saginata* e *T. asiatica* são próximas filogeneticamente e distanciam-se, no mesmo aspecto, de *T. solium*. *Taenia asiatica* é considerada a espécie “irmã” da *T. saginata*, diferindo apenas na morfologia e no DNA mitocondrial (HOBERG, 2002; EOM; JEON, 2006; MCMANUS, 2006; YAMASAKI et al., 2006).

Os tenídeos possuem corpos achatados dorso-ventralmente e divididos em cabeça ou escólex, colo ou pescoço e estróbilo ou corpo. O estróbilo é formado por uma cadeia de segmentos e cada segmento constitui uma proglote.

O escólex é o órgão de fixação dos tenídeos na mucosa do intestino delgado. O escólex de *T. saginata* possui forma quadrangular, com quatro ventosas e não possui rostelo ou rostro e nem acúleos; *T. solium* possui forma arredondada, com quatro ventosas e rostelo armado com dupla fileira de acúleos. O colo está situado imediatamente abaixo do escólex, constituindo a zona de crescimento ou de formação de proglotes (NASCIMENTO, 2000; REY, 2001).

As proglotes apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: proglotes jovens, maduras e grávidas. Cada proglote é hermafrodita, com um ou dois conjuntos de órgãos reprodutores; os poros genitais geralmente se abrem na borda ou nas bordas laterais do segmento. Podem ocorrer autofertilização e fertilização cruzada entre as proglotes. A proglote jovem contém apenas esboços de órgãos genitais, enquanto que a proglote madura contém órgãos genitais masculino e feminino desenvolvidos e aptos para a fecundação. (NASCIMENTO, 2000; REY, 2001)

Proglotes grávidas, em geral, saem intactas do estróbilo e são eliminadas com as fezes, em média dois a cinco segmentos, e duas a três vezes por semana. O número de ramificações uterinas laterais ocasionalmente pode ser usado como critério para diferenciar as proglotes de *T. saginata* e *T. solium*. As proglotes grávidas de *T. saginata* contêm cerca de 80.000 ovos cada uma e o útero possui de 14 a 32 ramificações laterais. As proglotes grávidas de *T. solium* contêm cerca de 40.000 ovos cada uma e o útero possui de 7 a 16 ramificações laterais. As ramificações uterinas são do tipo dendrítica em *T. solium* e do tipo dicotômica em *T. saginata* (GARCIA et al., 2003a; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

A eliminação de proglotes de *T. saginata* pelo hospedeiro ocorre de forma ativa, sendo expulsas com as fezes ou destacadas individualmente. Por possuírem musculatura pouco desenvolvida, as proglotes de *T. solium* são eliminadas passivamente com as fezes. Fora do corpo, os ovos são liberados por desintegração do segmento ou são expelidos através do poro genital (NASCIMENTO, 2000).

Os ovos, de aproximadamente 30 a 45µm de diâmetro, são esféricos e de aspecto radial quando observados à luz de microscopia óptica, possuem envoltório denominado embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto (seis ganchos), também denominado de oncosfera. Os ovos das duas espécies são idênticos, sendo impossível diferenciar quando examinados pelo microscópio óptico (NASCIMENTO, 2000; SCIUTTO et al., 2000; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006). A longevidade e a alta fecundidade do verme adulto, assim como a alta resistência dos ovos, que podem permanecer viáveis por mais de oito meses em locais quentes e úmidos, aumenta a possibilidade de transmissão (HOBERG, 2002; HOBERG, 2006).

As formas metacestódeas ou metacestódeos de *T. saginata* e de *T. solium* constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, de 0,5 a 2 centímetros de diâmetro, apresentando no seu interior, líquido vesicular e um escólex invaginado (SPINA-FRANÇA; LIVRAMENTO; MACHADO, 1993; SCIUTTO et al., 2000; REY, 2001).

1.2 – Ciclo Biológico do Complexo Teníase-Cisticercose

Cisticercose é uma condição reconhecida desde os mais remotos tempos; todavia, somente em 1855 teve seu ciclo esclarecido por Friedrich Küchenmeister. Em um ensaio, colocou metacestódeos na dieta alimentar de prisioneiros condenados; necropsiados meses após, identificou tênia no intestino da maioria deles (GARCIA et al., 2003a; HAWK et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006). Desta maneira, definiu que o

ciclo biológico implica em dois hospedeiros, ou seja, tipo heteroxeno, o homem como hospedeiro definitivo de *T. solium*, *T. saginata* e *T. asiatica*, e os suínos como hospedeiros intermediários de *T. solium* e *T. asiatica* e os bovinos como hospedeiros intermediários de *T. saginata* (CARPIO, 2002; HAWK et al., 2005; YAMASAKI et al., 2006).

No ciclo natural da cisticercose, os hospedeiros intermediários infectam-se por meio da ingestão de ovos do parasito. Esses ovos sofrem ação do suco gástrico, perdem os embrióforos e liberam os embriões hexacantos ou oncosferas. No intestino, por ação dos sais biliares e enzimas digestivas, ocorre a ativação das oncosferas que atravessam ativamente as vilosidades intestinais, penetram na corrente sangüínea e alcançam o tecido subcutâneo, músculo esquelético, sistema nervoso central e outros, transformando-se em metacestódeo. (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; HAWK et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006).

O homem ao ingerir carne crua ou mal cozida de suínos ou bovinos infectados com formas metacestódeas viáveis de *T. solium*, *T. saginata* ou *T. asiatica* desenvolverá a teníase. No tubo digestivo do homem, por ação de enzimas proteolíticas e sais biliares, as formas metacestódeas são liberadas das vesículas através de um processo de evaginação, que alcançam a parede do intestino delgado para iniciar sua transformação em verme adulto. (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; GARCIA et al., 2003a; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006; YAMASAKI et al., 2006). As proglotes grávidas são eliminadas de 60 a 70 dias após a ingestão da carne contaminada com os metacestódeos. Somente o homem tem sido encontrado com infecção natural por *T. solium*, ainda que experimentalmente tenha sido possível infectar algumas espécies de primatas (REY, 2001).

Estão principalmente sujeitas à teníase, os indivíduos que preparam alimentos e provam a carne antes de cozinhar e indivíduos que fazem refeições em lanchonetes e

restaurantes. Fatores econômicos, culturais (hábitos alimentares) e religiosos tendem a expor certos grupos de indivíduos em maior ou menor grau. Na culinária tradicional de muitas culturas, há pratos que utilizam carne crua, por exemplo, o quibe cru (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

Na cisticercose humana, o homem é hospedeiro intermediário acidental de *T. solium*, se infecta pela ingestão de ovos viáveis do parasito. Essa infecção pode ocorrer de várias maneiras: por meio da heteroinfecção que consiste na manipulação direta de água e alimentos contaminados com fezes humanas ou manipulação indireta através da irrigação e/ou fertilização com água e/ou esterco contaminados; a infecção também pode ocorrer por auto-infecção externa que consiste na ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio indivíduo portador da teníase, resultado de maus hábitos higiênicos (sobretudo a falta do hábito de lavar as mãos após a defecação); outra maneira de infecção é a auto-infecção interna resultante de movimentos antiperistálticos ou de vômitos que permitem a algumas proglotes retornarem ao estômago e aí sofrerem a ação do suco digestivo, o que permitirá a eclosão dos embriões infectantes (BARBOSA et al., 2000; REY, 2001; GARCIA et al., 2003a, HAWK et al., 2005). Além da auto-infecção interna, há relatos de meios alternativos de transmissão dos ovos de *T. solium* como coprofagia nos psicopatas, pelo ar e por moscas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

1.3 – Epidemiologia do Complexo Teníase-Cisticercose

O complexo teníase-cisticercose em humanos engloba, na realidade, duas doenças distintas, com sintomatologia e epidemiologia totalmente diferentes: a teníase e a cisticercose. A urbanização desordenada, vigilância sanitária deficiente, ausência de saneamento básico e educação sanitária são os principais fatores que potencializam esse complexo. Essa zoonose incide em países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento, principalmente os da Ásia,

África e América Latina (FLISSER et al., 2003; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003; KUMAR, 2004; BUCARDO et al., 2005; MEDINA et al., 2005; PREUX; DRUET-CABANAC, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), o complexo teníase-cisticercose acomete 50.000.000 de indivíduos em todo mundo provocando aproximadamente 50.000 óbitos anualmente. Estima-se que o Brasil gaste aproximadamente US\$85 milhões no tratamento de complicações da NC (PAL et al., 2000). Deste modo, a NC constitui um desafio importante para o sistema público de saúde do nosso país.

Dentre as condições sócio-econômicas e culturais que favorecem a manutenção do complexo teníase-cisticercose destacam-se: más condições de higiene pessoal, falta de água potável, irrigação de hortaliças com água contaminada e contaminação do meio ambiente com ovos do parasito provenientes de indivíduos infectados pela forma adulta de *T. solium*. Outro fator importante para manter a endemia de cisticercose numa dada região geográfica é o sistema primitivo de criação de suínos, pois permite o contato destes animais com fezes humanas mantendo o ciclo de vida de *T. solium*. Esse fator, aliado ao hábito de ingestão de carne suína mal-cozida (cozimento ideal é por 30 minutos a 77°C), aumenta a prevalência da teníase estritamente relacionada com a cisticercose. Trata-se, portanto de uma zoonose preocupante, sem, contudo, contar com programas de controle por parte dos órgãos governamentais (ROMÁN et al., 2000; SCIUTTO et al., 2000; HOBERG, 2002; MENDES et al., 2005).

A cisticercose mostrou-se mais freqüente em idades mais avançadas e os pacientes do sexo feminino são acometidos em maior proporção, principalmente em pacientes que apresentam manifestações graves e, a enfermidade está ligada a hábitos alimentares, sendo mais freqüente em pacientes com maior contato com o meio rural (AGAPEJEV, 1996; PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; AGAPEJEV, 2003; GARCIA et al., 2003a). Para alguns autores, a soroprevalência em humanos não apresenta diferenças entre sexo

(GARCIA-NOVAL et al., 1996; RODRIGUEZ-CANUL et al., 1999). Crianças são menos acometidas por neurocisticercose que os adultos, provavelmente pelo seu curto tempo de exposição e/ou sua diferente resposta imunitária. A maioria dos indivíduos infectados tem de 20 a 50 anos de idade (SCIUTTO et al., 2000; HOBERG, 2002; AGAPEJEV, 2003).

A análise de dados epidemiológicos quanto a cisticercose humana é um dos motivos importantes para entender a magnitude e distribuição dessa doença na América Latina. Em povoados do México, Guatemala, Bolívia, Peru e Equador têm demonstrado que a soroprevalência da NC varia entre 4,9% e 24% de uma população inteira (SCHANTZ; WILKINS; TSANG, 1998; WHITE, 2000; FLISSER et al., 2003).

Em comunidades rurais do México foi confirmada uma alta soroprevalência para cisticercose em humanos (43,8%) e uma frequência (9,1%) para a NC dos 649 habitantes analisados (FLEURY et al., 2006). Garcia-Noval et al. (1996), analisaram a população de duas comunidades rurais na Guatemala e verificaram que a soropositividade de cisticercose em humanos era maior na comunidade de piores condições sanitárias. Um estudo realizado por Rodriguez-Hidalgo et al. (2006) no Sul do Equador, demonstraram que 2,25% dos soros analisados foram positivos para antígenos circulantes de metacestódeos de *T. solium* e que a teníase foi detectada em 1,46% da população examinada, demonstrando uma forte associação no ciclo de vida entre indivíduos portadores, porcos com cisticercose e indivíduos soropositivos.

Estudos realizados na África, em especial na África Central e Ocidental, demonstraram que a cisticercose humana tem sido registrada em alguns países (Gana, Togo, Benin, Camarões e leste de Congo) (ZOLI et al., 2003). No norte do Togo, Dumas et al. (1990) registraram que a soropositividade de cisticercose foi de 2,4% e 29,5% na população adulta e em epiléticos, respectivamente. Na capital de Togo (Lome), a prevalência foi de 10,8% em pacientes epiléticos hospitalizados (GRUNITZKY et al., 1995). Em Benin,

estudos revelaram que a soroprevalência de cisticercose, em geral, foi de 1,3%, com prevalência significativamente maior em homens (1,9%) que em mulheres (0,8%), e que a prevalência se eleva com o aumento da idade (HOUINATO et al., 1998). Nguekam et al. (2003), estudaram três comunidades rurais de Camarões e demonstraram que a neurocisticercose foi presente em 59,1% dos soros humanos testados.

Na Ásia, a cisticercose é um grave problema de saúde pública, afetando milhões de indivíduos com graves manifestações neurológicas, além de perdas de ordem econômicas. A cisticercose é a causa de epilepsia em até 50% de pacientes da Índia e também, é a maior causa de epilepsia em Bali (Indonésia), Vietnã e possivelmente na China e Nepal. Estudos de soroprevalência indicam uma elevada taxa de *T. solium* em vários países (Vietnã, China, Coréia e Bali), com índices variando de 0,02 a 12,6%. A taxa de teníase tem sido registrada e variando entre 0,1 e 6% em comunidades da Índia, Vietnã, China e Bali (ITO; NAKAO; WANDRA, 2003; RAJSHEKHAR et al., 2003). Waikagul; Dekumyoy; Anantaphruti (2006) demonstraram na Tailândia, país sudeste da Ásia, que a teníase tem sido esporadicamente relatada. Entretanto, dados recentes apresentaram um aumento na prevalência da teníase (5,9%) em algumas aldeias do Norte do país, e entre amostras de fezes de 19 províncias do Nordeste (2,8%).

Recentemente, a cisticercose tem se tornado uma doença parasitária importante nos Estados Unidos (EUA), particularmente na Califórnia e em outros estados devido ao intenso fluxo de imigrantes hispânicos da América Latina. O número de casos diagnosticados em Los Angeles aumentou quatro vezes entre 1977 e 1981. Entre 1973 e 1983, mais de 500 casos foram relatados de quatro hospitais gerais de Los Angeles. Entre 1994 e 1998, uma média de 120 pessoas com cisticercose foi admitida em um Centro Médico de Los Angeles por ano. Em 1988 estimou-se que 1000 novos casos de neurocisticercose têm sido diagnosticados a cada

ano nos EUA (DEL BRUTTO et al., 2001; TERRAZA et al., 2001; ROCA et al., 2003; DEGIORGIO et al., 2005; HAWK et al., 2005).

Os países do leste da Europa controlaram a teníase e finalmente a erradicaram, através de conscientização social e educação sanitária. No entanto existe o risco de reintrodução devido ao aumento do número de imigrantes provenientes de áreas endêmicas (FLISSER et al., 2003; GARCIA et al., 2003a; ITO et al., 2003a; ITO et al. 2003b).

No Brasil, a incidência da neurocisticercose tem sido considerada baixa no nordeste brasileiro, porém uma elevada frequência é demonstrada em algumas áreas. Essa parasitose tem sido apresentada com frequência nos estados do sul, sudeste e centro-oeste do país, principalmente em indivíduos dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás (ALBUQUERQUE; GALHARDO, 1995; TREVISOL-BITTENCOURT; SILVA; FIGUEREDO, 1998; BRAGAZZA et al., 2002; GOMES et al., 2002; AGAPEJEV 2003; MENDES et al., 2005).

No município de Mulungu do Morro, Bahia, Gomes et al. (2002) demonstraram uma alta soroprevalência para cisticercose (1,6%) em pacientes epiléticos através do método de *Enzyme-Linked Immunoelctrotransferblot* (EITB) e para teníase (4,5%) através do ELISA. Entre 1996-2004, Façanha (2006), em um estudo retrospectivo realizado no Ceará, verificou que dos 424 pacientes com cisticercose internados em hospitais, 98,3% apresentaram neurocisticercose.

Na região Centro-Oeste, Oliveira et al. (2006), em um estudo soro-epidemiológico, demonstraram a endemicidade (11,3%) da cisticercose em habitantes na cidade de Catalão - Goiás.

No Estado do Rio de Janeiro, entre 1981 e 1989, mais de 100 casos novos de NC foram detectados. A precária condição sanitária e o baixo nível sócio- econômico da Baixada Fluminense induzem e permitem o acesso da população ao consumo da carne de má

qualidade, verduras e de águas contaminadas, permitindo o desenvolvimento do complexo teníase-cisticercose. Entre 1992 e 2002, foi realizado levantamento nos registros de tomografias de duas Unidades nessa região e foram encontrados 72 casos de NC, a maioria deles em mulheres (62,5%) e na fase crônica (93,1%) (MENDES et al., 2005).

No município de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, Takayanagui et al. (1996) obtiveram um coeficiente de prevalência da cisticercose de 54 casos/100.000 habitantes através de notificação compulsória, e Chimelli; Lovalho; Takayanagui (1998) obtiveram prevalência de 67 casos/100.000 habitantes através de necropsias realizadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, no período de 1992 a 1997.

Em estudos realizados em cinco municípios do estado do Paraná, Lonardoni et al. (1996) obtiveram através da reação de imunofluorescência indireta 3,2% de pacientes positivos para *C. cellulosae* das 2.180 amostras de soro analisadas. Em 38,2% dos casos foi relatada a presença de suínos e em 8,8% a presença de bovinos próxima ao local de residência dos pacientes; 22,1% dos pacientes tinham ou tiveram *Taenia* sp., demonstrando a precariedade do saneamento desta população. O maior risco de contrair doenças desta natureza é o consumo ou convívio direto com animais criados em condições inadequadas de higiene.

Na região do Triângulo Mineiro, Costa-Cruz et al. (1995) verificaram a ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas no período de 1971 a 1993 em Uberlândia-MG e detectaram prevalência de 1,4%, sendo a localização mais freqüente o SNC. Gobbi et al. (1980) relatando que em 2.306 necropsias realizadas em indivíduos falecidos em Uberaba-MG foram encontrados 2,4% de casos de cisticercose e destes 66% foram de NC. Um estudo realizado por Silveira-Lacerda et al. (2002) em quatro cidades do Triângulo Mineiro constatou a soroprevalência da cisticercose em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre de

Minas (4,8%) e Uberlândia (4,7%), demonstrando assim a endemicidade da cisticercose na população amostrada e a problemática do complexo teníase-cisticercose na região.

1.4 – Medidas de Controle para o Complexo Teníase-Cisticercose

A aplicação de medidas para o controle da teníase-cisticercose depende das características epidemiológicas da enfermidade na região, incluindo condições econômicas, sociais e culturais. A estratégia fundamental consiste em interromper o ciclo evolutivo do parasito, a fim de evitar a infecção nos animais e na população humana. (ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994; PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES 2000; NASH, 2003; ESTEVES; SILVA-VERGARA; CARVALHO, 2005; PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005; EDDI et al., 2006).

Qualquer controle deve reconhecer a multiplicidade de fatores que interagem para a ocorrência da enfermidade, sejam fatores biológicos, ou o impacto sócioecológico na dinâmica de transmissão. As estratégias consistem, fundamentalmente, em: melhoramento das condições de saneamento do meio ambiente; tratamento em massa da população; melhoramento da criação de animais (evitar o acesso de animais a fezes humanas); promover inspeção de produtos cárneos; praticar o cozimento adequado da carne de suínos; evitar o abate e comércio de produtos clandestinos; educação em saúde da população, enfatizando a adoção de hábitos de higiene, como lavar as mãos antes de se alimentar, preparar alimentos e após utilizar o banheiro (GEMMEL, 1987; ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD, 1994; SCIUTTO et al., 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; HOBBERG, 2002; GONZALEZ et al., 2003; SARTI; RAJSHEKHAR, 2003; MONTRESOR; PALMER, 2006; GARCIA et al., 2007).

Para países endêmicos, além das medidas citadas acima, poderiam ser adotadas medidas para o congelamento da carne com o objetivo de diminuir a transmissão da

enfermidade (SOTELO; ROSAS; PALENCIA, 1986; FAN et al., 1998). Com base nas medidas de controle indicadas acima, é sugerida a implementação de programas de educação em saúde por entidades locais para a população congelar a carne a temperaturas inferiores a -5°C pelo menos durante 6 dias. Essas medidas vêm sendo tomadas por alguns frigoríficos do Paraná, antes mesmo da distribuição da carne para o mercado consumidor. Esses frigoríficos mantêm as peças dos animais congeladas à temperatura de -5°C por dez dias consecutivos, diminuindo a transmissão da enfermidade, pois a inviabilidade do cisticercos pode ocorrer com a cocção ou fervura acima de 90°C por quatro horas ou o congelamento de -5°C por quatro dias (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES 2000; FALAVIGNA-GUILHERME et al., 2006).

Consideráveis trabalhos têm desenvolvido vacinas efetivas contra cisticercose em animais como medida profilática. Alguns autores têm utilizado antígenos de excreção/secreção de oncosfera, pois tem provocado uma intensa resposta imune protetora contra várias espécies de *Taenia* sp. (HUERTA et al., 2000; TOLEDO et al., 2001; PLANCARTE et al., 1999; VERASTEGUI et al., 2002; LIGHTOWLERS, 2003; EDDI et al., 2006; LIGHTOWLERS, 2006a; LIGHTOWLERS, 2006b).

O envolvimento de agências, instituições e organizações internacionais, tais como o WHO, o Food and Agriculture Organization (FAO), o International Livestock Research Institute (ILRI) e Fundação Bill e Melinda Gates, bem como, o compromisso de políticos e cientistas são essenciais para auxiliar na compreensão dos melhores métodos de diagnóstico, tratamento e conseqüentemente, no controle e erradicação da cisticercose humana (EDDI; NARI; AMANFU, 2003; EDDI et al., 2006; FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006; SCHANTZ, 2006).

Segundo a OPAS, a notificação compulsória da cisticercose é o melhor recurso para a investigação epidemiológica e análise comparativa da prevalência nas diferentes localidades. Permite, adicionalmente, o mapeamento do local de residência dos pacientes para melhor

direcionamento das medidas de prevenção. Embora o Ministério da Saúde do Brasil recomende a implementação da notificação compulsória do complexo teníase-cisticercose, apenas os Estados de Santa Catarina, Paraná, parte do estado de Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e a localidade de Ribeirão Preto (SP) implantaram programas de combate e controle da teníase-cisticercose. O descaso quanto a essa recomendação constitui elemento importante para que os dados sobre incidência e prevalência da NC mantenham-se subestimados, tornando as informações apenas aparentes e provavelmente distantes da realidade (TAKAYANAGUI et al., 1996; CHIMELLI et al., 1998; AGAPEJEV, 2003).

1.5 – Resposta Imune e Relação Parasito-Hospedeiro da Cisticercose Humana

Vários estudos em modelos experimentais têm investigado os mecanismos da resposta imune provocado contra a forma metacestódea de *T. solium*. Alguns desses apresentam claramente a heterogeneidade da resposta imune humoral, a existência de mecanismos evasivos, e o fato que a resposta imune pode proteger ou prejudicar o hospedeiro (CARPIO, 2002; FLISSER; CORREA; EVANS, 2002).

O modo de vida da forma metacestódea pode causar infecção assintomática durante a evasão ativa e supressão da imunidade. Em estudos histopatológicos tem demonstrado que os metacestódeos viáveis apresentam uma branda ou nenhuma reação inflamatória circundante, geralmente, consistindo de áreas com linfócitos e poucos eosinófilos. A ausência ou reduzida inflamação é resultado da secreção de serina proteases, que inibem a ativação do complemento, a ativação de linfócitos e a produção de citocinas, com destaque para as interleucinas IL-2, IL-5 e IL10. Em contraste, a resposta imune mediada ao redor de um ou mais metacestódeos em degeneração pode precipitar-se em uma resposta inflamatória evidente, através da proliferação de linfócitos e posterior diferenciação em células efetoras tipo Th1 e Th2, com subsequente produção de várias citocinas, ou de células plasmáticas, com

conseqüente produção de anticorpos específicos (WHITE, 2000; CARPIO, 2002; FLISSER; CORREA; EVANS, 2002; SCIUTTO et al., 2007).

1.6 – Sintomatologia da Cisticercose Humana

A forma metacestódea de *T. solium* acomete principalmente a musculatura estriada em suínos. Em humanos, essa forma pode instalar praticamente em todos os órgãos do corpo, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, sistema nervoso central (SNC) e, raramente a cavidade oral (CHANG; KEANE, 2001; ELIAS et al., 2005; PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005; DELGADO-AZAÑERO et al., 2007; JAY et al., 2007), sendo o SNC a localização mais importante por sua freqüência e gravidade, visto que acomete grande número de pessoas e produz algumas vezes sintomatologia grave (COSTA-CRUZ, et al., 1995; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; LIMA et al., 2004). No SNC, as formas metacestódeas podem se localizar no parênquima cerebral, espaço subaracnóide, sistema ventricular e medula espinhal, causando a NC (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; HOBERG, 2002; GARCIA et al., 2003a).

As manifestações clínicas da NC são resultantes da interação parasito-hospedeiro, bem como do número, tamanho, localização e viabilidade das formas metacestódeas de *T. solium*, e da intensidade da resposta imune do hospedeiro contra o parasito, com isso, não existe um quadro patognomônico ou uma síndrome típica da NC (AGAPEJEV, 2003; GARCIA et al., 2003a; HANCOCK et al., 2004; HAWK et al., 2005; TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006). Porém essas manifestações podem variar de assintomáticas a episódios graves. No entanto, a NC, cujas manifestações clínicas mais freqüentes são cefaléia e convulsões, podem ser confundidas com epilepsia idiopática e cefaléia crônica.

1.7 – Diagnóstico da Cisticercose Humana

Atualmente, um diagnóstico acurado para NC humana é baseado na combinação de dados clínicos, epidemiológicos, reações sorológicas específicas no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR) e de achados de neuroimagens (PIERPONT; LAGUNA; SEEGER, 2000, GARCIA et al., 2005; HAWK et al., 2005). Os critérios (absolutos, maiores, menores e epidemiológicos) para a definição do diagnóstico da cisticercose e da NC foram estabelecidos por Del Brutto et al. (1996) e revisados por Del Brutto et al. (2001). Esses últimos critérios classificaram o diagnóstico da NC em definitivo e provável, no entanto, os mesmos não foram vastamente avaliados em países onde a NC é endêmica (YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005).

Técnicas de neuroimagens tais como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) têm contribuído para um diagnóstico mais acurado e entender melhor a patofisiologia da NC. Somente a presença de lesões císticas mostrando o escólex tem sido considerada patognomônico (DEL BRUTTO et al., 2001; CASTILLO, 2004; ARRUDA; QUAGLIATO; ROSSI, 2006). Devido ao alto custo dessas técnicas, principalmente em países em desenvolvimento, essas tecnologias não estão disponíveis para a maioria da população. (SCIUTTO et al., 2000; SOTELO; DEL BRUTTO, 2000; GARCIA; DEL BRUTTO, 2005).

O imunodiagnóstico da cisticercose humana é um procedimento de baixo custo e possui métodos responsáveis para a detecção de anticorpos IgG anti-metacésteos de *T. solium* e de antígenos circulantes do parasito em amostras de soro, LCR, saliva e sangue em papel de filtro (ARAMBULO et al., 1978; COSTA et al., 1982; COSTA, 1986; SCIUTTO et al., 2000; DORNY et al., 2003).

Diferentes técnicas tem sido descrito para detectar anticorpos IgG específicos de *T. solium*, tais como Reação de Hemaglutinação Indireta, Radioimunoensaio, Reação de Fixação de Complemento, ELISA e *Immunoblotting* (IB). Atualmente, os testes imunológicos mais

utilizados são ELISA e o IB (TSANG; BRAND; BOYER, 1989; GARCIA; SOTELO, 1991; FERREIRA et al., 1997; ITO et al., 1998; SCIUTTO et al., 2000; DORNY et al., 2003; HAWK et al., 2005).

O teste ELISA foi inicialmente aplicado no diagnóstico de cisticercose por Arambulo et al. (1978), com extrato salino deslipidizado de *T. solium* adulta e cisticerco como antígeno. Este teste foi padronizado no Brasil por Costa et al. (1982), utilizando três antígenos de metacestódeos de *T. solium* (líquido de vesícula, extrato salino e extrato alcalino) em amostras de LCR, demonstraram sensibilidade e especificidade próximos a 100%. O teste ELISA apresenta várias vantagens, pois permite a análise de grande número de amostras simultaneamente, os reagentes são estáveis, a especificidade é alta, leitura dos resultados é automática e de fácil interpretação. Várias publicações têm apresentado diferentes índices de sensibilidade e especificidade nesse método, muitas vezes em função da população estudada, da preparação antigênica (extrato salino total, líquido de vesícula, extrato alcalino total, extrato de escóceles ou membrana do parasito), da gravidade das lesões e das reações imunológicas provocadas no hospedeiro devido aos diferentes estágios do metacestódeo e da amostra testada (MORAKOTE et al., 1992; WHITE; ROBINSON; KUHN, 1997; SCIUTTO et al., 2000; SHIGUEKAWA et al., 2000; BARCELOS et al., 2001; DORNY et al., 2003; HAWK et al., 2005; ISHIDA et al., 2006; BARCELOS et al., 2007).

A utilização de antígenos recombinantes e semi-purificados foram avaliados para o imunodiagnóstico da cisticercose e os resultados obtidos pelo ELISA foram satisfatórios para detecção de anticorpos específicos (SAKO et al., 2006; SATO et al., 2006; IUDICI NETO et al., 2007).

A purificação de antígenos glicoprotéicos de metacestódeos de *T. solium* e sua utilização no teste de IB foi padronizada por Tsang; Brand; Boyer (1989) e os resultados obtidos demonstraram que os índices de sensibilidade e especificidade foram elevados no

diagnóstico de NC, tanto em amostras de soro quanto em LCR. O IB tem sido utilizado no estudo da NC observando diferenças na sensibilidade e eficiência, muitas vezes em função dos extratos antigênicos utilizados e da forma da doença, onde uma menor eficiência é observada na forma calcificada e em casos de cistos únicos (MARETTI, 1999). A combinação do testes ELISA e IB na detecção de anticorpos específicos em amostras de soro e de LCR de pacientes com NC, frente aos extratos totais de metacestódeos de *T. solium* ou *T. crassiceps*, representam uma alternativa mais viável nos países em desenvolvimento (SIMAC, et al., 1995; VAZ; NUNES; PIAZZA, 1997; GEKELER et al., 2002; MACEDO et al., 2002; PROAÑO-NARVAEZ et al., 2002; BARCELOS et al., 2005; PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005; ISHIDA et al., 2006; BARCELOS et al., 2007).

A detecção de antígenos também pode favorecer o diagnóstico da cisticercose. Vários ensaios têm sido desenvolvidos para detectar antígenos, mas somente testes baseados em anticorpos monoclonais têm apresentado maior reprodutibilidade e especificidade (BRANDT et al., 1992; WANG; ZHANG; GE, 1992; DORNY et al., 2003; GARCIA et al., 2005; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006; SCHANTZ, 2006). O teste ELISA para a captura de antígeno de metacestódeos circulantes é uma ferramenta eficiente para o acompanhamento do tratamento de pacientes com NC, pois o antígeno circulante não é mais detectado no soro de pacientes curados após 1 a 3 meses de tratamento (DORNY; BRANDT; GEERTS, 2004). No entanto, não há evidências de que o teste ELISA para detecção de antígenos seja melhor que o teste ELISA para detecção de anticorpos (ITO; CRAIG, 2004).

1.8 – Antígenos Alternativos no Diagnóstico da Cisticercose Humana

Os avanços no diagnóstico sorológico da NC consistem na identificação e síntese de antígenos específicos para se obter ensaios com alta sensibilidade e técnicas de fácil

reprodutibilidade que não dependam do suprimento contínuo de parasito para preparo antigênico (GARCIA et al., 2005; FERRER et al., 2007a).

O perfil de peptídeos antigênicos reconhecidos pelos anticorpos IgG presentes em amostras de LCR de pacientes com NC, frente aos extratos salinos das formas metacestódeas de *T. solium* (homólogo) e *T. crassiceps* (heterólogo); extratos sulfato de duodecil de sódio (SDS) homólogo e heterólogo, foram demonstrados por Barcelos et al. (2001). Nesse estudo, as frequências de reatividade de anticorpos IgG específicos foram elevadas frente aos quatro extratos antigênicos analisados por ELISA. Nunes et al., 2000, analisaram quatro antígenos (líquido de vesícula e extratos salinos total) de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps* para o imunodiagnóstico da cisticercose suína através do ELISA indireto e analisaram que o antígenos de líquido de vesícula e extratos salinos total de *T. crassiceps* apresentaram uma sensibilidade de 100 e 96,4%, respectivamente. Bueno et al., 2000 detectaram anticorpos IgG específicos em amostras pareadas de LCR e soro de pacientes com NC, utilizando antígenos de líquido de vesícula e extratos salinos total de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps*, respectivamente e registraram elevados índices de sensibilidade e especificidade.

Diferentes formas do antígeno *T. saginata* tem apresentado ótimos resultados. Oliveira et al (2007), demonstraram uma alta sensibilidade nos testes ELISA e IB quando usaram antígenos do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* no diagnóstico sorológico da NC humana. Morakote et al. (1992) utilizaram proglotes de forma adulta de *T. saginata* como antígeno heterólogo no teste ELISA para o diagnóstico da NC humana. Ferrer et al. (2003) utilizaram peptídeos sintéticos de proteínas imunogênicas da oncosfera de *T. saginata* no diagnóstico da cisticercose bovina, demonstrando bom desempenho.

1.9 – Extratos Antigênicos Purificados

A utilização de diferentes extratos antigênicos da forma metacestódea de *T. solium* (extrato salino total, líquido de vesícula e extrato alcalino total) resultam em diferenças significantes nos testes imunológicos (COSTA, 1986). Essa variedade de antígenos tem demonstrado pouco específica devido a frações comuns a outros antígenos. Com o objetivo de melhorar estes resultados vários métodos de purificação de extratos antigênicos têm sido descritos mostrando sensibilidade e especificidade de 90% a 100% (DEKUMYOY et al., 2004; PRABHAKARAN et al., 2004; YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005). Através de isoeletrofocalização foi possível obter 100% de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da NC (ITO et al., 1998; KO; NG, 1998).

Peptídeos purificados estão sendo considerados excelentes candidatos a antígenos para o uso em testes imunológicos, pela alta sensibilidade e especificidade e por demonstrar pouquíssimas reações cruzadas (SALINAS et al., 1996; GAUCI; LIGHTOWLERS, 2001; GARCIA et al., 2003b; GONZÁLEZ et al., 2007, FERRER et al., 2007a).

Os peptídeos sintéticos também vêm demonstrando ser uma área de pesquisa promissora tanto para uso em testes imunológicos quanto no desenvolvimento de vacinas (GEVORKIAN et al., 1996; FERRER et al., 2003; FLEURY et al., 2003; BUENO et al., 2005; SCHEEL et al., 2005; FERRER et al., 2007b).

1.9.1 – Purificação com Triton X-114

Fracionamentos realizados pelo Triton X-114 (TX-114) têm sido aplicados e resultados satisfatórios têm sido obtidos devido à utilização da fração hidrofóbica (detergente) recuperada durante o fracionamento, demonstrando ser um promissor candidato a antígeno em sorodiagnóstico utilizando ELISA com substancial sensibilidade, especificidade e segurança. A purificação de proteínas durante a fase de separação em TX-114 vem sendo relatada para

diferentes patógenos (CHATURVEDI; GUPTA, 2001; GARG et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

A solução detergente TX-114 é homogênea a 0°C, mas separa-se em fração aquosa e fração detergente em temperaturas superiores a 20°C. Proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fração aquosa, e proteínas integrais de membrana (proteínas hidrofóbicas) são recuperadas na fração detergente. A purificação de antígenos utilizando TX-114 apresenta diversas vantagens quando comparado a outros métodos de purificação, pois não necessita de equipamentos sofisticados, sendo de extração simples, fácil e altamente eficiente e não precisa de custo alto para produção em laboratório (BORDIER, 1981; BRICKER et al., 2001).

Diante a dificuldade de obtenção de suínos naturalmente infectados com metacestódeos de *T. solium* e da importância do diagnóstico da NC, a obtenção de extratos antigênicos alternativos purificados que demonstrem altos índices de sensibilidade e especificidade se faz necessária.

2 – OBJETIVOS

2.2 – Objetivo geral:

- Avaliar as frações detergente e aquosa do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* como antígenos alternativos purificados no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana, utilizando os testes ELISA e *Immunoblotting*.

2.2 – Objetivos específicos:

- Obter o extrato salino total da forma metacestódea de *T. saginata*;
- Purificar o extrato S por hidrofobicidade através do uso do Triton X-114 para obtenção das frações: Detergente e Aquosa;
- Analisar o perfil eletroforético das amostras antigênicas em SDS-PAGE 12% pela coloração do gel por nitrato de prata;
- Detectar anticorpos IgG específicos frente aos três extratos antigênicos obtidos nas amostras de soro humano pelos testes ELISA e *Immunoblotting*.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU).

3.2 – Procedência das amostras de soro

As 115 amostras de soro foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – MG (HC-UFU) ou de indivíduos voluntários sadios.

As amostras de sangue foram colhidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU por punção venosa e enviadas para o Laboratório de Referência Nacional no Diagnóstico de Cisticercose da UFU para a obtenção dos soros por centrifugação. As amostras de soro foram divididas em alíquotas de 500 µl em tubos de “Eppendorf”, identificadas e conservadas a – 20 °C até o momento do uso.

As amostras de soro padrão positivos foram obtidas de dois pacientes com diagnóstico confirmado de NC através de tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância magnética (RM), testes imunológicos, história clínica e dados epidemiológicos do paciente.

As amostras de soro padrão negativos foram obtidas de três indivíduos sadios, que em três exames parasitológicos de fezes pelo método de Hoffmann, Pons e Janer (HPJ) (HOFFMANN, PONS E JANER, 1934) foram negativos para *Taenia* sp. e que não apresentaram história anterior de teníase-cisticercose.

As 115 amostras de soro foram divididas em três grupos:

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

Foram utilizadas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC de acordo com os critérios propostos por Del Brutto et al. (2001). Sob tais critérios, um diagnóstico definitivo de NC é realizado de duas maneiras: a primeira é pela presença de um critério absoluto que poderia ser a demonstração histológica do parasito por biópsia, visualização do escólex da forma metacestódea por TC ou RM ou a visualização direta do parasito na subretina através do exame de fundo de olho; e a outra maneira, é a presença de dois critérios principais, um critério secundário e um critério epidemiológico.

Os critérios principais podem ser a visualização por exames de imagens de calcificações sugestivas de NC, amostras sorológicas positivas pelo EITB para detecção de anticorpos anti-metacestódeos de *T. solium*, resolução de lesões císticas intracranianas após tratamento com albendazol e praziquantel ou ainda a resolução espontânea de pequenas lesões. Os critérios secundários podem ser a visualização por exames de imagens de lesões compatíveis com NC (hidrocefalia), manifestações clínicas sugestivas de NC, amostras sorológicas positivas pelo teste ELISA tanto na detecção de anticorpos como na detecção de antígenos ou visualização por exames de raio-x de cisticercose fora do SNC (cisticercos muscular ou subcutâneo). Aos critérios epidemiológicos estão relacionados: o convívio com pessoas infectadas por *T. solium*, indivíduos provenientes de regiões endêmicas para a cisticercose ou história de viagem freqüente para áreas endêmicas.

Neste estudo os pacientes com diagnóstico definitivo foram selecionados por um critério absoluto que, no presente estudo, foi à visualização por imagem do escólex da forma metacestódea de *T. solium*.

No grupo 1, 18 (45%) indivíduos pertenciam ao sexo feminino e 22 (55%) ao sexo masculino, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) entre o número de mulheres e de homens. A média das idades foi de 37 anos (variando entre 10 e 61 anos).

3.2.2 – Amostras de soro de pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2)

Com o objetivo de verificar a reatividade cruzada nos métodos imunológicos, como já demonstrado por alguns autores (LARRALDE *et al.*, 1989; MONTENEGRO *et al.*, 1994), foram utilizadas 45 amostras de soro de pacientes infectados por: *Schistosoma mansoni* (5), *Ascaris lumbricoides* (6), *Hymenolepis nana* (4), *Strongyloides stercoralis* (4), hidatidose por *Echinococcus granulosus* (6), Ancilostomídeos (5), *Enterobius vermicularis* (5), *Taenia* sp. (8) e *Trichuris trichiura* (2). As amostras de soro foram colhidas de indivíduos com exames parasitológicos de fezes positivos após a análise de três amostras fecais pelos métodos de HPJ e/ou Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948), sendo todas triadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU.

No grupo 2, 21 (60%) indivíduos pertenciam ao sexo feminino e 14 (40%) ao sexo masculino, não havendo diferença estatística ($p>0,05$) entre o número de mulheres e de homens. A média das idades foi de 25 anos (variando entre 08 e 70 anos). As amostras sorológicas infectadas por *E. granulosus*, doadas pelo Laboratório Central de Porto Alegre, não apresentaram idade e sexo acessíveis. E algumas amostras sorológicas infectadas por *S. mansoni*, cedidas pelo Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia, não apresentaram idade e sexo acessíveis.

3.2.3 – Amostras de soro controle de indivíduos saudáveis (Grupo 3)

Foram utilizadas 30 amostras de soro de indivíduos assintomáticos que em três exames parasitológicos de fezes realizados pelo método de HPJ foram negativos para parasitos intestinais e que não tinham história anterior de teníase-cisticercose.

No grupo 3, 18 (60%) indivíduos pertenciam ao sexo feminino e 12 (40%) ao sexo masculino, não havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre o número de mulheres e de homens. A média das idades foi de 21 anos (variando entre 02 e 35 anos).

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

Os metacestódeos de *T. saginata* foram obtidos de músculos esqueléticos de bovinos naturalmente infectados. Os metacestódeos foram retirados por dissecação, lavados em solução salina (NaCl, 0,15 M) por quatro vezes, identificados e armazenados a -20°C .

3.4 – Extratos antigênicos

3.4.1 – Preparo do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata*

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

A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soro albumina bovina (BSA) (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA), posteriormente o antígeno foi dividido em alíquotas de 1 mL em tubos de “Eppendorf”, identificadas e conservadas a – 20°C, até o momento do uso.

3.4.2 – Purificação do extrato salino total através de Triton X-114 para obtenção de frações hidrofóbica e hidrofílica

As frações antigênicas hidrofóbica (detergente) e hidrofílica (aquosa) foram obtidas como descrito por Bordier (1981), com algumas modificações, através de fracionamento com Triton X-114 (TX-114) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO). Foram preparados 3 lotes de fracionamentos com TX-114 para obtenção de antígenos suficientes para todas as reações sorológicas: ELISA e *Immunoblotting*.

Para cada lote, uma porção do extrato S de metacestódeo de *T. saginata* (8,4 mg) foi utilizada, constituindo a amostra protéica, na qual foi adicionado em 1680 µL de Tris (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) e 1% TX-114. A solução foi homogeneizada e mantida a 0°C por 10 minutos (1ª etapa). Para separação das proteínas um gradiente de 6% de sacarose, 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl e 0,06% de TX-114 foi adicionado, na proporção de 2:3, e incubado a 37°C por 10 minutos (2ª etapa). A solução foi então centrifugada por 10 minutos a 3000 x g a 25°C (3ª etapa). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo cônico e a fração rica em detergente, ou seja, a fração mais densa foi armazenada no mesmo tubo (4ª etapa). Ao sobrenadante obtido na 4ª etapa foi acrescentado 1% de TX-114 a fresco, em seguida a solução foi homogeneizada e mantida a 0°C por 10 minutos (5ª etapa). A solução obtida na 5ª etapa foi transferida para o tubo armazenado na 4ª etapa, e então mantida a 37°C por 10 minutos, centrifugada a 3000 x g a 25°C por 10 minutos (6ª etapa). O sedimento obtido na 6ª etapa constituiu a fração detergente (D). Ao sobrenadante da 6ª etapa

foi adicionado (1:1) de Tris e 4% de TX-114 sem sacarose. Esta solução foi homogeneizada e mantida a 0°C por 10 minutos, posteriormente a 37°C por 10 minutos e centrifugada a 3.000 x g a 25°C por 10 minutos (7ª etapa). O sobrenadante desta etapa constituiu a fração aquosa (A) e o sedimento foi descartado.

As proteínas purificadas (frações D e A) foram precipitadas em acetona PA (Merck) na proporção de 1:2 (v/v), a 4°C por 18 horas e centrifugada a 1580 x g, a 4°C, por 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de Tris. A dosagem protéica foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a BSA (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA).

3.5 - Análise do perfil eletroforético das amostras antigênicas em SDS-PAGE 12%

O extrato S e as frações D e A obtidas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, sob condições não-redutoras, segundo Laemmli, (1970). O gel foi preparado entre placas de vidro medindo 10 x 10 cm que foram montadas empregando-se espaçadores de teflon de 0,75 mm de espessura e suporte apropriado de vedação.

Para a preparação do gel de separação, utilizou-se: Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 (Sardi, Brasil); SDS 0,1% (Pharmacia); ácido etileno-diamino-tetra-ácetico 2 mM (EDTA) (Gibco-Brl, USA); acrilamida a 29% (Pharmacia); bis-acrilamida (N,N'-Metileno-bis-acrilamida) a 1% (Sigma); água destilada; N,N,N,N-tetrametil-amonometano a 0,125% (TEMED) (Sigma) e persulfato de amônio a 0,125% (APS) (Vetec, Brasil). A mistura foi colocada lentamente nas placas montadas, tomando-se o cuidado para evitar a formação de bolhas no interior do gel. Para evitar a polimerização do gel em presença de oxigênio, foi colocada uma camada de 80

μL de butanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) (Vetec), e descartada posteriormente, após a polimerização do gel de separação.

Em seguida, foi realizada a preparação do gel de empilhamento com Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%; EDTA 2 mM; acrilamida a 29%; bis-acrilamida a 1%; água destilada; TEMED 0,125 % e APS 0,125%. O gel de empilhamento foi depositado na placa sobre o gel de separação e colocou-se o pente (molde de teflon) para a formação dos poços de aplicação, aguardando-se a sua polimerização.

Nas placas contendo o gel a 12% foram aplicados, após fervura em banho-maria a 100°C durante três minutos, os antígenos diluídos v/v em tampão de amostra (10X), na concentração de 20 μg de proteínas para o procedimento de coloração do gel por nitrato de prata (Merk).

3.6 - Coloração do Gel por Nitrato de Prata

As proteínas em estudo foram visualizadas por coloração em nitrato de prata (AgNO_3) de acordo com Friedman (1982), na qual os polipeptídeos se destacam em tons de amarelo-ferrugem, e comparadas aos padrões de peso moleculares das proteínas: β -galactosidase de *Escherichia coli* (116 kDa), fosforilase b de músculo de coelho (97 kDa), frutose-6-fosfato kinase de músculo de coelho (84 kDa), soro albumina bovina (66 kDa), albumina de ovo de galinha (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de coelho (36 kDa) anidrase carbônica de eritrócitos de bovino (29 kDa) e α -lactalbumina bovina (14 kDa).

Após migração das proteínas o gel foi cuidadosamente mergulhado em solução fixadora [metanol a 50% (Merck), ácido acético a 12% (Merck), formaldeído a 0,05% (VETEC) em água destilada] por uma hora, em seguida o gel submetido a três banhos, em etanol (Merck) a 50%, de 10 minutos cada e um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta-hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 0,02% (Merck) por um minuto. O gel foi lavado três

vezes por 20 segundos cada em água destilada e impregnado com solução de formaldeído a 0,04% adicionada de nitrato de prata (AgNO_3) a 2%, em câmara escura por 20 minutos. O gel foi lavado três vezes em água destilada por 20 segundos cada e revelado em solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3); 0,05% de formaldeído e 2% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,02% (Merck) até o aparecimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com solução de metanol a 50%, ácido acético puro a 10% e o gel foi estendido entre folhas de celofane para secar.

3.7 - Testes Imunológicos

3.7.1 - Teste ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de *T. solium*

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o ELISA através de titulações em bloco dos conjugados nas seguintes diluições 1:500; 1:1000; 1:2000 e 1:4000.

Os testes ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro utilizando o extrato S e os antígenos purificados foram padronizados a partir do protocolo de Costa (1986) com algumas modificações. Placas de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como suporte para adsorção dos extratos antigênicos. As placas foram sensibilizadas com 50 μL de solução dos extratos antigênicos, na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M pH 9,6), a 4°C durante 18 horas, em câmara úmida. Após este período e três lavagens de 5 minutos em PBS-T foram adicionados 50 μL das amostras de soro a serem testadas (diluídas 1:200 em PBS-T). Em todas as placas foram incluídos controles de reação que constituíram de duas amostras de soro padrão positivo e três amostras de soro padrão negativo. Após incubação por 45 minutos a 37°C e três lavagens de cinco minutos com PBS-T foi adicionado 50 μL do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co, USA), diluído na

concentração ideal de 1:2000 em PBS-T. As placas foram novamente incubadas por 45 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após três lavagens a reação foi revelada pela adição de 50 µL do substrato H₂O₂ e solução cromógena de orto-fenilenodiamina (OPD) (Merck, Germany) preparado no momento do uso (5 mg de OPD + 12,5 mL de tampão citrato fosfato pH 5,0 + 5 µL de H₂O₂ 30%), (H₂O₂, Merck). Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de solução de H₂SO₄ 2 N, (Merck).

Os valores da absorbância (densidade óptica: DO) foram determinados a 492 nm em leitor de ELISA (Tp Reader, Thermoplate, China) e o limiar de reatividade (*cut-off*) foi calculado pela média aritmética das densidades ópticas das três amostras de soro padrão negativo, acrescidas de dois desvios padrão. O índice de reatividade (IR) foi calculado através da divisão do valor das DO das amostras pelo valor do *cut-off* para cada extrato antigênico obtido (PARDINI et al., 2002). Os resultados foram considerados positivos quando IR > 1. Foram calculadas as médias geométricas (mg) dos IR para cada grupo em cada extrato antigênico.

3.7.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida e *Immunoblotting* para detecção de IgG

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de analisar as condições ótimas para o *Immunoblotting* através de titulações em bloco dos soros nas seguintes diluições 1:50; 1:100 e 1:200 e dos conjugados nas seguintes diluições 1:500; 1:1000; 1:1500 e 1:2000.

A técnica de *Immunoblotting* (IB) foi realizada para caracterizar o perfil de proteínas dos metacestódeos, reconhecidas pelos anticorpos presentes nas amostras de soros. Os extratos antigênicos foram submetidos a SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970), juntamente com padrões de alto e baixo peso molecular.

Após a migração eletroforética das proteínas foi realizada a transferência dos géis para membranas de nitrocelulose porosidade de 0,45 μm , segundo técnica descrita por TOWBIN, STAEBELIN, GORDON (1979) com algumas modificações. Foi preparado um “sandwich” com: três folhas de papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida contendo frações antigênicas e mais três folhas de papel de filtro, todos umedecidos em tampão de transferência [TRIS 25 mM, glicina 192 mM (Sigma) e metanol a 20%] e colocados em uma cuba de transferência para aplicação de uma corrente elétrica de 0,8 mA por cm^2 , totalizando 120 mA e 250 V, durante três horas.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com solução de Ponceau S (Sigma Chemical Co, USA) a 0,5% em ácido acético a 1%, para verificar a confirmação da eficiência da transferência. As membranas de nitrocelulose, contendo as frações protéicas, foram cortadas em tiras verticais de 3 mm de largura.

A reação de IB foi iniciada após a identificação das tiras e a lavagem das mesmas com água destilada para eliminar a solução de Ponceau. A primeira etapa da reação consistiu em bloquear os sítios inespecíficos com 1 mL/tira de PBS-T acrescido de 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) durante duas horas, à temperatura ambiente sob agitação horizontal lenta. Após este período, desprezou-se a solução bloqueadora. Antes de adicionar as amostras de soro, cada caneleta contendo as tiras foi lavada com PBS-T acrescido de leite desnatado (PBS-TM 1%) e foram adicionados às tiras 500 μL das amostras de soro na diluição de 1:100 em PBS-TM 1%, as tiras foram então incubadas por 18 horas a 4°C sob agitação horizontal lenta. Posteriormente, realizaram-se seis ciclos de lavagens durante cinco minutos cada, com PBS-T 1%. Após as lavagens foram adicionados 500 μL do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical Co, USA), diluído a 1:1500 em PBS-TM 1%. A reação foi incubada por duas horas sob agitação lenta e contínua à temperatura ambiente. As tiras foram submetidas a seis lavagens de cinco minutos cada em PBS pH 7,2. A revelação da

reatividade foi efetuada pela adição de 20 pastilhas de diaminobenzidina (DAB) e 20 pastilhas de peróxido de hidrogênio a 100 mL de água deionizada.

Após a visualização das frações antigênicas (kDa), a reação foi interrompida por lavagens sucessivas em água destilada. As tiras foram envolvidas por folhas de papel e colocadas sobre a bancada para a secagem a temperatura ambiente. Após a secagem, as tiras foram estocadas até o momento da análise.

Posteriormente, foram realizados os cálculos do peso molecular aparentemente de cada fração antigênica reconhecida pelos anticorpos presentes nas amostras de soro testadas.

3.8 - Normas de Biossegurança

Todo o procedimento de colheita e manuseio do material biológico e dos reagentes e a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança de Chaves-Borges; Mineo (1997).

3.9 - Análise Estatística

A sensibilidade, especificidade e a eficiência do diagnóstico (ED) foram calculadas de acordo com Barbieri et al. (1998) e o “*Youden index*” (YI) foi determinado de acordo com Younden (1950). Foram utilizadas as seguintes definições: verdadeiro positivo (Vp), verdadeiro negativo (Vn), falso positivo (Fp) e falso negativo (Fn).

$$\text{Sensibilidade \%} = \text{Vp} \times 100 / (\text{Vp} + \text{Fn})$$

$$\text{Especificidade \%} = \text{Vn} \times 100 / (\text{Vn} + \text{Fp})$$

$$\text{ED \%} = (\text{Vp} + \text{Vn}) \times 100 / (\text{Vp} + \text{Fp} + \text{Vn} + \text{Fn})$$

$$\text{YI} = (\text{Vp} \times \text{Vn}) - (\text{Fn} \times \text{Fp}) / (\text{Vp} + \text{Fn}) \times (\text{Fp} + \text{Vn})$$

O peso molecular dos peptídeos foi estimado a partir da curva de regressão linear construída pelos valores dos pesos moleculares dos marcadores em relação ao Rf (motilidade relativa), utilizando o “Software GraphPad Prism versão 3.0” (GraphPad Prism Software, Inc.). O Rf de cada peso molecular foi obtido através da fórmula:

$$\text{Rf} = \text{Distância da origem à migração} / \text{Distância da origem até o ponto de referência}$$

As análises estatísticas dos resultados do teste ELISA foram realizadas a partir dos programas de computação “Software GraphPad Prism versão 3.0” (GraphPad Prism Software, Inc.) para a confecção do gráfico e o “Software *BioEstat* versão 2.0” para comparação entre os extratos antigênicos obtidos e entre os grupos para cada extrato (diferença entre duas proporções). Foram considerados significantes os resultados a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 – RESULTADOS

4.1 – Dosagem protéica dos extratos antigênicos

A concentração protéica do extrato salino total (S) de metacestódeos de *T. saginata* foi de 4190 µg/mL. Através de três fracionamentos com TX-114 do extrato S, obteve-se as seguintes concentrações: 250 µg/mL, 307 µg/mL e 409 µg/mL para a fração detergente (D) e 1350 µg/mL, 2510 µg/mL e 2730 µg/mL para a fração aquosa (A).

4.2 – SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%

O perfil eletroforético dos antígenos do extrato S e da fração A de metacestódeos de *T. saginata*, em SDS-PAGE (12%) através da coloração pelo nitrato de prata, mostrou muitas bandas, enquanto que o antígeno da fração D mostrou claramente quatro bandas definidas com aparente peso molecular de 70, 64, 50 e 39 kDa (Fig. 1).

4.3 – ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os resultados dos testes ELISA dos 40 pacientes com diagnóstico definitivo de NC (Grupo 1), 45 pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2) e 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3), respectivamente.

A Figura 2 demonstra os níveis de IgG sérica determinados por ELISA utilizando o extrato S metacestódeos de *T. saginata* e suas frações (D e A). No Grupo 1, houve diferença significativa entre os extratos S e fração A, e entre as frações D e A. No Grupo 2, a diferença estatística foi observada somente entre as frações D e A. Não houve diferença significativa entre os extratos no Grupo 3.

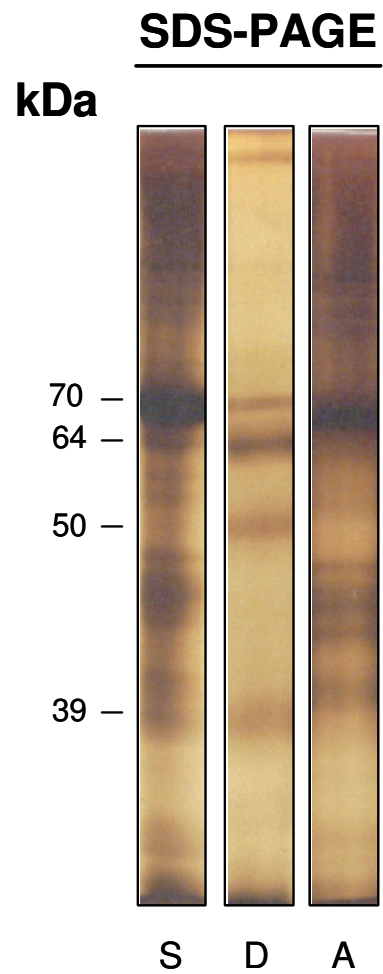


Figura 1. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% corado pela prata do extrato salino total (S), das frações detergente (D) e aquosa (A) de metacestódeos de *T. saginata*. Padrões de peso moleculares são

Tabela 1. Resultado do teste ELISA dos 40 pacientes com neurocisticercose (Grupo 1), para detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S), as frações detergente (D) e aquosa (A).

| Caso | Sexo | Idade (anos) | ELISA-IgG | | |
|------|------|-----------------|-----------|---|---|
| | | | S | D | A |
| 1 | F | 28 | + | + | - |
| 2 | F | 37 | + | + | - |
| 3 | F | 14 | + | + | + |
| 4 | M | 51 | + | + | - |
| 5 | M | 53 | + | + | - |
| 6 | M | 41 | + | + | - |
| 7 | M | 36 | - | - | + |
| 8 | M | 30 | + | + | - |
| 9 | F | 19 | + | + | + |
| 10 | M | 29 | + | + | - |
| 11 | F | 41 | + | + | - |
| 12 | M | 61 | + | + | - |
| 13 | M | 18 | + | + | - |
| 14 | M | 35 | + | + | - |
| 15 | F | 44 | + | + | - |
| 16 | M | 26 | + | + | - |
| 17 | M | 29 | + | + | - |
| 18 | F | 57 | + | + | - |
| 19 | F | 33 | + | + | - |
| 20 | M | 60 | + | + | + |
| 21 | M | 60 | + | + | - |
| 22 | M | 46 | + | + | + |
| 23 | M | 10 | + | + | + |
| 24 | M | 10 | + | + | - |
| 25 | F | 50 | - | - | - |
| 26 | F | 46 | + | + | + |
| 27 | F | 16 | + | + | - |
| 28 | F | 41 | + | + | + |
| 29 | F | 49 | + | + | - |
| 30 | F | 28 | + | + | - |
| 31 | M | 43 | + | + | - |
| 32 | M | 38 | + | + | - |
| 33 | M | 32 | + | + | + |
| 34 | M | 27 | + | + | + |
| 35 | F | 35 | + | + | + |
| 36 | F | 53 | + | + | + |
| 37 | F | 28 | + | + | - |
| 38 | M | 30 | + | + | - |
| 39 | M | 44 | + | + | + |
| 40 | F | 43 | + | + | + |

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

Tabela 2. Resultado do teste ELISA dos 45 pacientes infectados por *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2), para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S), as frações detergente (D) e aquosa (A).

| Caso | Sexo | Idade (anos) | Parasito | ELISA-IgG | | |
|------|------|-----------------|------------------------|-----------|---|---|
| | | | | S | D | A |
| 1 | F | 14 | Ancilostomídeo | - | - | + |
| 2 | F | 12 | Ancilostomídeo | - | - | + |
| 3 | F | 9 | Ancilostomídeo | - | - | + |
| 4 | M | 11 | Ancilostomídeo | + | - | + |
| 5 | F | 23 | Ancilostomídeo | + | - | + |
| 6 | F | 9 | <i>A. lumbricoides</i> | + | + | + |
| 7 | M | 12 | <i>A. lumbricoides</i> | + | + | + |
| 8 | M | 14 | <i>A. lumbricoides</i> | + | + | + |
| 9 | F | 8 | <i>A. lumbricoides</i> | + | - | + |
| 10 | M | 14 | <i>A. lumbricoides</i> | - | - | + |
| 11 | M | 8 | <i>A. lumbricoides</i> | + | + | + |
| 12 | F | 10 | <i>E. vermicularis</i> | + | - | + |
| 13 | F | 14 | <i>E. vermicularis</i> | - | - | + |
| 14 | M | 10 | <i>E. vermicularis</i> | - | - | + |
| 15 | F | 23 | <i>E. vermicularis</i> | - | - | + |
| 16 | M | 10 | <i>E. vermicularis</i> | + | - | + |
| 17 | M | 61 | <i>S. stercoralis</i> | + | - | + |
| 18 | F | 54 | <i>S. stercoralis</i> | - | - | - |
| 19 | M | 39 | <i>S. stercoralis</i> | - | - | + |
| 20 | M | 39 | <i>S. stercoralis</i> | - | - | + |
| 21 | F | 31 | <i>T. trichiura</i> | - | - | - |
| 22 | M | 10 | <i>T. trichiura</i> | - | - | - |
| 23 | M | 40 | <i>H. nana</i> | + | + | + |
| 24 | F | 41 | <i>H. nana</i> | - | - | - |
| 25 | M | 45 | <i>H. nana</i> | + | + | + |
| 26 | F | 22 | <i>H. nana</i> | + | + | + |
| 27 | M | 29 | <i>S. mansoni</i> | - | - | - |
| 28 | * | * | <i>S. mansoni</i> | - | - | - |
| 29 | * | * | <i>S. mansoni</i> | - | - | + |
| 30 | * | * | <i>S. mansoni</i> | - | - | - |
| 31 | * | * | <i>S. mansoni</i> | - | - | - |
| 32 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 33 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 34 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 35 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 36 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 37 | ** | ** | <i>E. granulosus</i> | + | + | + |
| 38 | F | 23 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 39 | F | 25 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 40 | F | 70 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 41 | F | 30 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 42 | F | 40 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 43 | F | 30 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 44 | F | 30 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |
| 45 | F | 8 | <i>Taenia</i> sp. | - | - | - |

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo; * = amostras sorológicas cedidas pelo laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia (idade e sexo não acessíveis); ** = amostras sorológicas doadas pelo laboratório Central de Porto Alegre (idade e sexo não acessíveis)

Tabela 3. Resultado do teste ELISA dos 30 indivíduos aparentemente saudáveis (Grupo 3) para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* em amostras de soro, utilizando como antígeno o extrato salino total (S), as frações detergente (D) e aquosa (A).

| Caso | Sexo | Idade (anos) | ELISA-IgG | | |
|------|------|-----------------|-----------|---|---|
| | | | S | D | A |
| 1 | F | 23 | - | - | - |
| 2 | M | 5 | - | - | - |
| 3 | F | 24 | - | - | - |
| 4 | M | 24 | - | - | - |
| 5 | M | 21 | - | - | - |
| 6 | F | 22 | - | - | - |
| 7 | M | 6 | - | - | - |
| 8 | F | 25 | + | - | - |
| 9 | F | 24 | - | - | - |
| 10 | M | 25 | - | - | - |
| 11 | F | 25 | - | - | - |
| 12 | F | 25 | - | - | - |
| 13 | F | 25 | - | - | - |
| 14 | M | 19 | - | - | - |
| 15 | M | 23 | - | - | - |
| 16 | F | 35 | - | - | - |
| 17 | F | 23 | - | - | - |
| 18 | M | 24 | - | - | - |
| 19 | M | 26 | - | - | - |
| 20 | F | 19 | - | - | - |
| 21 | M | 24 | - | - | - |
| 22 | F | 25 | - | - | - |
| 23 | F | 28 | - | - | - |
| 24 | F | 4 | - | - | - |
| 25 | F | 2 | - | - | - |
| 26 | F | 24 | - | - | - |
| 27 | F | 25 | - | - | - |
| 28 | M | 23 | - | - | - |
| 29 | F | 21 | - | - | - |
| 30 | M | 23 | - | - | - |

F = Feminino; M = Masculino; - = Negativo; + = Positivo

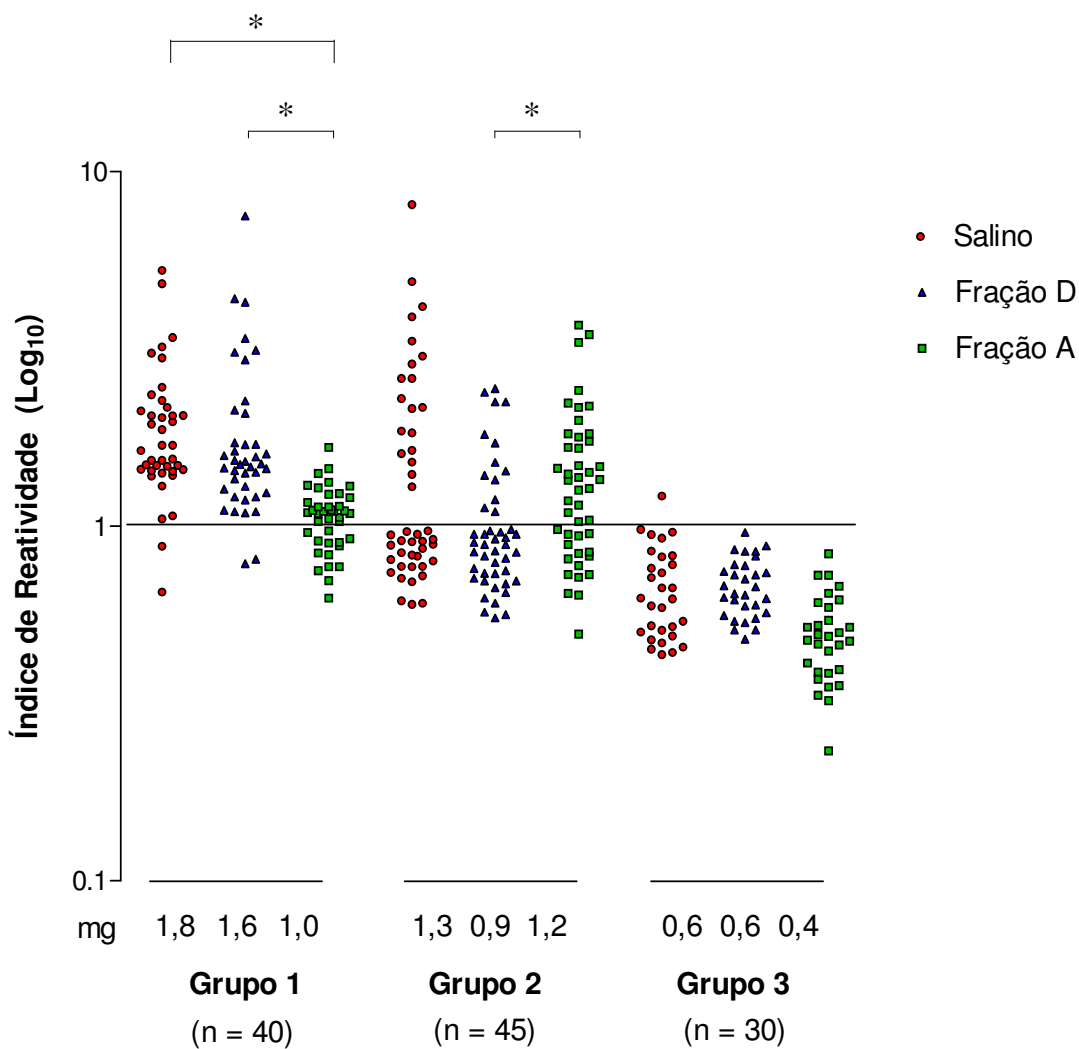


Figura 2. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro de pacientes com diagnóstico de NC (Grupo 1; n = 40), pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2; n = 45) e indivíduos saudáveis (Grupo 3; n = 30) utilizando os antígenos: extrato salino total (Salino), as frações detergente (Fração D) e aquosa (Fração A). A barra horizontal indica o *cut off*, mg: média geométrica, * p < 0,005.

No Grupo 2, 42,2% e 64,4% das amostras de soro foram positivas para os antígenos do extrato S e da fração A, respectivamente. Somente 28,9% das amostras de soro deste grupo foram positivas para o antígeno da fração D. Todas as amostras de soro do grupo 3 foram negativas para ambos os antígenos das frações D e A, enquanto 3,3% das amostras deste grupo foram positivas para o antígeno do extrato S.

A sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e *Youden Index* para os três antígenos estudados no ELISA demonstraram que para os antígenos do extrato S e da fração D no Grupo 1 foram mais sensíveis (95%), enquanto que o uso do antígeno da fração A nesse grupo demonstrou baixa sensibilidade (65%). Em relação aos outros cálculos, o antígeno D demonstrou ser mais específico e mais eficiente em relação aos outros extratos antigênicos (Tabela 4).

A reatividade cruzada no ELISA para o Grupo 2 foi predominantemente encontrada em amostras de soro de pacientes com *Echinococcus granulosus*, *Ascaris lumbricoides* e *Hymenolepis nana* (Tabela 5).

4.4 – Immunoblotting para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*

Todas as amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC foram analisadas pelo IB. No entanto, para os Grupos 2 e 3 apenas as amostras positivas no ELISA foram submetidas a este teste (Fig. 3). As bandas antigênicas imunoreativas reconhecidas pelas amostras de soro de pacientes do Grupo 1 e 2 variaram de 116 a 24 kDa para os antígenos do extrato S e da fração D e 116 a 13 kDa quando usou o antígeno da fração A (Fig. 4).

A banda antigênica de 70-64 kDa visualizada no antígeno da fração D reagiu fortemente com os pacientes com diagnóstico definitivo de NC (Fig. 4A). Em contraste, pacientes com infecção por *Echinococcus granulosus* não apresentaram reatividade com a banda antigênica de 70-64 kDa, ainda que foi observado a presença de várias bandas antigênicas (116, 110, 97, 87, 68, 45, 42-39 e 24 kDa) (Fig. 4B). Para o antígeno da fração A, a reatividade foi observado principalmente para bandas antigênicas de alto peso molecular.

Tabela 4. Sensibilidade, especificidade, eficiência do diagnóstico (ED) e o *Youden Index* do ELISA na detecção de anticorpos IgG anti-metacésteo de *Taenia solium* em amostras de soro, utilizando o extrato salino total (S), as frações detergente (D) e aquosa (A).

| ELISA | | | | |
|--------------|-------------------|--------------------|--------|---------------------|
| Antígeno | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) | ED (%) | <i>Youden Index</i> |
| S | 95 | 73,3 | 83,9 | 0,74 |
| D | 95 | 82,6 | 88,5 | 0,80 |
| A | 65 | 61,3 | 72,8 | 0,46 |

Tabela 5. Reatividade cruzada em amostras de pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos (Group 2, n = 45) utilizando o extrato salino total (S), as frações detergente (D) e aquosa (A) de metacestódeos de *Taenia saginata* pelo ELISA.

| | Número de amostras examinadas | S | D | A |
|----------------------------------|----------------------------------|----------|----------|---------|
| | | n+ (%) | n+ (%) | n+ (%) |
| <i>Ascaris lumbricoides</i> | 6 | 5 (83,3) | 4 (66,7) | 6 (100) |
| <i>Echinococcus granulosus</i> | 6 | 6 (100) | 6 (100) | 6 (100) |
| <i>Enterobius vermicularis</i> | 5 | 2 (40) | 0 (0) | 5 (100) |
| <i>Hymenolepis nana</i> | 4 | 3 (75) | 3 (75) | 3 (75) |
| Ancilostomídeos | 5 | 2 (40) | 0 (0) | 5 (100) |
| <i>Schistosoma mansoni</i> | 5 | 0 (0) | 0 (0) | 1 (20) |
| <i>Strongyloides stercoralis</i> | 4 | 1 (25) | 0 (0) | 3 (75) |
| <i>Taenia</i> sp. | 8 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Trichuris trichiura</i> | 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Total | 45 | 19 | 13 | 29 |

n+ = amostras positivas

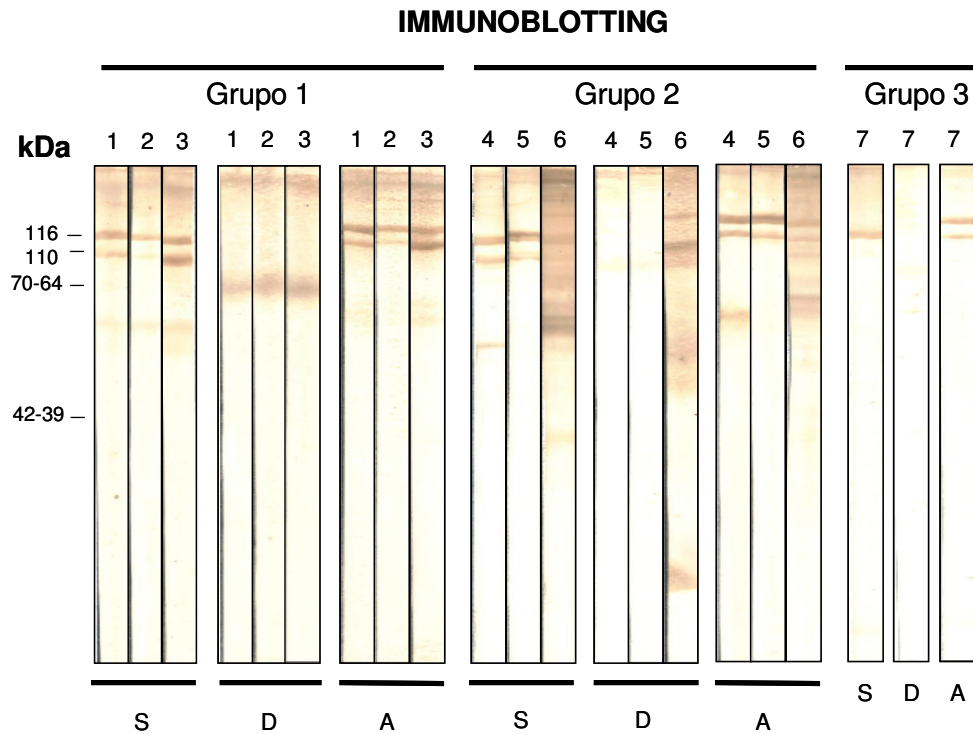


Figura 3. *Immunoblotting* do extrato salino total (S), das frações detergente (D) e aquosa (A) de metacestódeos de *T. saginata*. Amostras de soro representativas de paciente com NC (Grupo 1; tiras de 1 – 3), pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos (Grupo 2; *Ascaris lumbricoides* tira 4; *Hymenolepis nana* tira 5; *Echinococcus granulosus* tira 6) e indivíduos saudáveis (Grupo3;

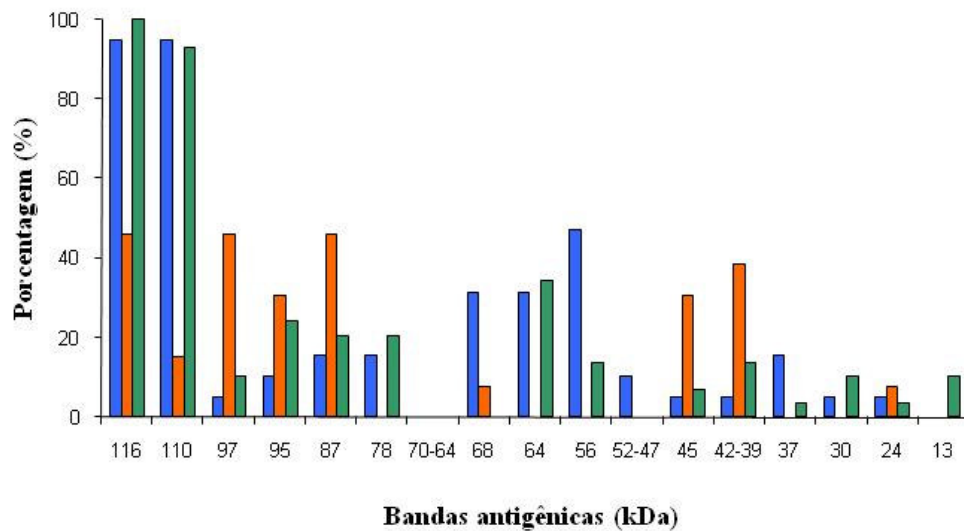
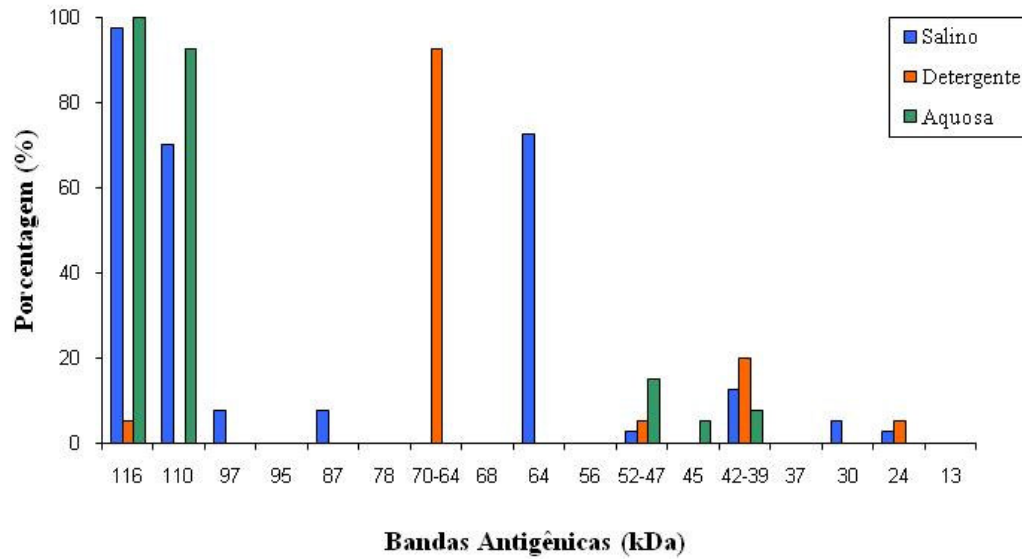


Figura 4. Porcentagem das amostras de soro reativas por *Immunoblotting* utilizando os antígenos do extrato salino total (Salino), e das frações detergente (Detergente) e aquosa (Aquosa) de metacestódeos de *T. saginata*. **(A)** Grupo 1: amostras de soro positivas no ELISA de pacientes com diagnóstico definitivo de NC; **(B)** Grupo 2: amostras de soro positivas no ELISA de pacientes com *Taenia* sp. e por outros parasitos.

5 – DISCUSSÃO

A utilização de antígenos heterólogos no diagnóstico da NC humana, tanto em soro quanto em LCR, tem sido descrita principalmente com antígeno de *T. crassiceps* (LARRALDE et al., 1989; VAZ; NUNES; PIAZZA, 1997; BARCELOS et al., 2001; BARCELOS et al., 2005), mas a facilidade de obter metacestódeos de *T. saginata* na região do Triângulo Mineiro possibilita a produção do antígeno heterólogo a partir destes metacestódeos (REIS et al., 1996; REIS; RAGHIANTE, 2000).

No presente estudo, foi realizado que pela primeira vez o fracionamento do extrato S de metacestódeos de *T. saginata* em duas frações, a detergente (D) e a aquosa (A), usando o Triton X-114 (TX-114). O TX-114 tem sido aplicado na purificação de diversos outros parasitos, tais como: *Plasmodium* sp. (SMYTHE et al., 1988; SHARMA et al., 2007), *Schistosoma japonicum* (ROGERS et al., 1988), *Trypanosoma* sp. (BALBER; HO, 1988; ALVES et al., 2007), *Leishmania* sp. (MURRAY; SPITHILL; HANDMAN, 1989; HEATH et al., 1987; GARG et al., 2005; AZEVEDO-PEREIRA et al., 2007) e *T. solium* (MACHADO et al., 2007).

Resultados satisfatórios têm sido obtidos usando antígenos de fração D, onde o desempenho dos antígenos das proteínas presente na membrana integral foi recuperado pela fração D durante o fracionamento com TX-114, demonstrando ser um promissor candidato a antígeno em sorodiagnóstico utilizando ELISA com substancial sensibilidade, especificidade e segurança (CHATURVEDI; GUPTA, 2001; GARG et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

No presente estudo, o antígeno de fração D mostrou ser mais específico que os outros extratos antigênicos e mostrou que nenhuma das amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis foi reativa a este antígeno. O cálculo de eficiência do diagnóstico e *Youden Index* reafirmam o ótimo desempenho do ELISA utilizando o antígeno de fase D de

metacestódeos de *T. saginata* para o diagnóstico da NC humana. Similar resultado foi obtido pelo fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de *T. solium* (MACHADO et al., 2007).

A baixa sensibilidade e especificidade da fração A de metacestódeos de *T. saginata*, obtida neste trabalho, inviabiliza a sua utilização para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeo de *T. solium* no diagnóstico sorológico da NC, concordando com os resultados obtidos para a fração aquosa de *T. solium* (MACHADO et al., 2007).

Neste estudo, quando utilizou o antígeno da fração D purificado pelo TX-114, a reatividade cruzada no ELISA ocorreu principalmente em amostras de soro de pacientes com *E. granulosus*, *A. lumbricoides* e *H. nana*. Para o antígeno de fração A, a reatividade cruzada foi observada na maioria das amostras de soro de pacientes infectados com outros parasitos, exceto para *Taenia* sp. e *Trichuris trichiura*. Os resultados obtidos sugerem que o teste ELISA seja utilizado na triagem e o *Immunoblotting* como teste confirmatório.

Vários estudos têm demonstrado que antígenos de metacestódeos de *Taenia* sp. parecem ser estágio específicos, uma vez que são bastante sensíveis em amostras de soro de indivíduos infectados com a forma metacestódea e altamente específicos em amostras de soro de indivíduos infectados com *Taenia* sp. (CHUNG et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007; ZHENG et al., 2007).

A baixa especificidade de antígenos dos extratos salinos totais de metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata* tanto no ELISA quanto no IB, em pacientes infectados por *E. granulosus* tem sido demonstrada por diversos autores (ISHIDA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). O fato de esses parasitos pertencerem à mesma família (Taeniidae) também pode ser um fator importante nesta reatividade cruzada (BENITEZ et al., 1998; GARCIA et al., 2003; ISHIDA et al., 2003; MCMANUS, 2006; GONZÁLEZ et al., 2007).

Esses componentes antigênicos homólogos entre esses cestódeos pode ser demonstrado através da análise das várias bandas imunodominantes comuns encontradas entre eles. Sete bandas imunodominantes (135, 100, 86, 64, 39, 35 e 24 kDa) foram reconhecidas pelos soros de indivíduos infectados com *E. granulosus* no IB usando o líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium* (KONG et al., 1989). No presente estudo, amostras de soro dos pacientes infectados com *E. granulosus* reconheceram várias bandas imunogênicas (116, 110, 97, 95, 87, 78, 68, 64, 56, 52-47, 45, 42-39, 37, 30 e 24 kDa), estes dados coincidem com a literatura, uma vez que as bandas de 64-68, 39-42 e 24 kDa foram identificadas por Oliveira et al. (2007), usando o extrato salino total de metacestódeo de *T. saginata*. No trabalho desenvolvido por Benitez et al. (1998), eles demonstraram uma grande similaridade entre antígenos recombinantes de oncosfera de *T. saginata* com proteínas de superfície protoescólex de *E. multilocularis* e *E. granulosus*.

A reatividade cruzada em pacientes infectados com *A. lumbricoides* pode estar relacionada a infecções concomitantes desses indivíduos com ambas as espécies, visto que a cidade de Uberlândia e a região do Triângulo Mineiro são consideradas endêmicas para cisticercose humana (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002). Além disso, o clima, a pobreza, e o saneamento básico e o fornecimento de água inadequados nesta região são condições importantes para manter essas espécies de helmintos (BETHONY et al., 2006). Adicionalmente, esta reatividade pode ser presumida a presença de anticorpos residuais como expressão da presença de metacestódeos calcificados, como freqüentemente encontrado em área endêmica.

Reatividade cruzada entre indivíduos infectados com *H. nana* foi observado e isso tem sido evidenciado também no trabalho de Shiguekawa et al. (2000). Este fato está associado à proximidade filogenética entre *Taenia* sp. e *Hymenolepis* sp. (família Taeniidae), e pela

presença de componentes antigênicos semelhantes entre essas espécies (MONTENEGRO et al., 1994; GARCIA et al., 2003).

A elevada sensibilidade e especificidade do IB utilizando o antígeno da fração D pode estar relacionado à banda 70-64 kDa, uma proteína imunodominante para o diagnóstico de pacientes com NC, visto que a proteína com 70-50 kDa tem sido relatado para *T. solium* em outro estudo, mostrando níveis satisfatórios de sensibilidade e especificidade (MACHADO et al., 2007).

Os dados obtidos neste estudo reafirmam estudos prévios de outros autores, enfatizando que bandas com pesos moleculares acima de 80 kDa não são marcadores importantes no diagnóstico da NC, pois aparecem com maior frequência em indivíduos com outras parasitoses ou saudáveis (SHIGUEKAWA et al., 2000; BARCELOS et al., 2007; MACHADO et al., 2007).

Quando foi utilizado o antígeno do extrato S no IB, várias bandas foram reconhecidas tanto em pacientes com NC quanto em pacientes com *E. granulosus*, com esse antígeno não foi possível obter diferenciação entre esses dois cestódeos. Entretanto, este problema não foi observado no antígeno de fase D, uma vez que as amostras de pacientes com NC e os seis pacientes com *E. granulosus* positivos no ELISA apresentaram diferença nos perfis das bandas, o que de fato, permitiu discriminar entre esses pacientes.

6 – CONCLUSÕES

- Foi possível purificar o extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* através do Triton X-114, obtendo duas frações antigênicas: fração hidrofóbica (detergente) e fração hidrofílica (aquosa).
- A fração hidrofóbica foi mais específica, que os demais extratos antigênicos analisados, na detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*.
- A fração hidrofóbica do extrato salino total de metacestódeos de *T. saginata* pode ser utilizada no *Immunoblotting* como antígeno heterólogo purificado no diagnóstico sorológico da neurocisticercose humana.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGAPEJEV, S. Epidemiology of neurocysticercosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, 207–216, 1996.

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

ALBUQUERQUE, E. S. de; GALHARDO, I. Neurocisticercose no Estado do Rio Grande do Norte - relato de oito casos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, n. 3-A, p. 464-470, 1995.

ALVES, C. R.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; MELLO, C. B; GARCIA, E. S.; NOGUEIRA, N. F.; BOURGUINGNON, S. C.; de SOUZA, W.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M. S. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.

ARAMBULO III, P. V.; WALLS, K. W.; BULLOCK, S.; KAGAN, I. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Acta Tropica**, v. 35, n.1, p. 63-67, 1978.

ARRUDA, G. C.; QUAGLIATO, E. M. A. B.; ROSSI, C. L. Intrathecal synthesis of specific immunoglobulin G antibodies in neurocysticercosis: evaluation of antibody concentrations by enzyme-linked immunosorbent assay using a whole cysticercal extract and cyst vesicular fluid as antigens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n. 1, p. 45-49, 2006.

AYRES, M.; AYRES, JR. M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Software, version 2.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2000, p. 250.

AZEVEDO-PEREIRA, R. L.; PEREIRA, M. C. S.; OLIVERIA-JUNIOR, F. O. R.; BRAZIL, R. P.; CÔRTEZ, L. M. C.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, A. L. S.; TOMA, L.; ALVES, C. R. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3-4, p. 234-239, 2007.

BAERMANN, S. Eine Einfache Methode zur Auffindung Von Ankylostomum (Nematoden) – Larven in Erdproden. **Mededeel mit. h. Geneesk. Lab Weltevredem Feestbundel, Batavia**, p. 41-47, 1917.

BALBER, A. E.; HO, L. M. *Trypanosoma brucei gambiense*: partitioning of glycopeptides of bloodstream and procyclic forms in Triton X-114. **Experimental Parasitology**, v. 65, n. 2, p. 290-293, 1988.

*Segundo normas da ABNT, NBR 6023/2002 com algumas modificações.

- BARBIERI, M.; FERNÁNDEZ, V.; GONZÁLEZ, G.; LUACES, V. M.; NIETO, A. Diagnosis evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hidatidosis. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 2, p. 51-61, 1998.
- BARBOSA, A. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, S. A.; CAMPOS, D. M. B. Cisticercose: fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro, diagnóstico e soroprevalência. **Revista de Patologia Tropical**, v. 29, n. 1, p. 17-29, 2000.
- BARCELOS, I. S. C.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 3, p. 219-226, 2001.
- 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, n. 4, p. 427-429, 2005.
- BARCELOS, I. S.; MOURA, L. P.; COSTA, V. P.; FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia solium* metacestode 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, n. 6, p. 713-717, 2007.
- BENITEZ, L.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GONZALEZ, L. M.; GOTTSTEIN, B.; GARATE, T. Sequence and immunogenicity of the *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus* spp. **Parasitology Research**, v. 84, n. 5, p. 426-431, 1998.
- BETHONY, J. M.; LOUKAS, A.; HOTEZ, P. J.; KNOX, D. P. Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. **Parasitology**, v. 133 Supplement 2, p. S63-79, 2006.
- BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981.
- BRAGAZZA, L. M.; VAZ, A. J.; PASSOS, A. D. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; NAKAMURA, P. M.; ESPÍNDOLA, N. M.; PARDINI, A.; BUENO, E. C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and Immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 7-12, 2002.
- BRANDT, J. R. A.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRIJS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 471-477, 1992.

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, n. 3, p. 350-356, 2001.

BUCARDO, F.; MEZA-LUCAS, A.; ESPINOZA, F.; GARCÍA-JERÓNIMO, R. C.; GARCÍA-RODEA, R.; CORREA, D. The seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis among epileptic patients in Leon, Nicaragua, as evaluated by ELISA and western blotting. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 41-45, 2005.

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, n. 1, p. 146-151, 2000.

BUENO, E. C.; SCHEEL, C. M.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; TAKAYANAGUI, O. M.; TSANG, V. C. W.; HANCOCK, K. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 3, p. 278-283, 2005.

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

CASTILLO, M. Imaging of neurocysticercosis. **Seminars in Roentgenology**, v. 39, p. 465-473, 2004.

CHANG G. Y.; KEANE J. R. Visual loss in cysticercosis: Analysis of 23 patients. **Neurology**, v. 57, p. 545-548, 2001.

CHATURVEDI, V.; GUPTA, H.P. Evaluation of integral membrane antigens of *Mycobacterium habana* for serodiagnosis of extrapulmonary tuberculosis: association between levels of antibodies and *Mycobacterium tuberculosis* antigens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2001.

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

CHIMELLI, L.; LOVALHO, A. F.; TAKAYANAGUI, O. M. Neurocysticercosis: contribution of the autopsies in consolidation of the compulsory notification in Ribeirão Preto – SP, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 577-584, 1998.

CHUNG, J. Y.; YUN, D. H.; EOM, K. S.; KANG, S. Y.; KONG, Y.; CHO, S. Y. *Taenia solium*: identification of specific antibody binding regions of metacestode 10-kDa protein. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 87-94, 2002.

COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 44, p. 15-31, 1986.

COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M.; CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, n. 6, p. 337-341, 1982.

COSTA-CRUZ, J. M.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; MORAES, A. T.; GUIMARÃES, A. H. B.; SALOMÃO, E. C.; ALCÂNTARA, T. M. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 53, n. 2, p. 227-232, 1995.

DEGIORGIO, C. M.; MEDINA, M. T.; DURÓN, R.; ZEE, C.; ESCUETA, S. P. Neurocysticercosis. **Epilepsy currents**, v. 4, n. 3, p.107-111, 2004.

DEGIORGIO, C.; PIETSCH-ESCUETA, S.; TSANG, V.; CORRAL-LEYVA, G.; NG, L.; MEDINA, M. T.; ASTUDILLO, S.; PADILLA, N.; LEYVA, P.; MATINEZ, L.; NOH, J.; LEVINE, M.; DEL VILLASENOR, R.; SORVILLO, F. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in Califórnia, USA. **Acta Neurológica Scandinavica**, v. 111, n. 2, p. 84-88, 2005.

DEKUMYOY, P.; WAIKAGUL, J.; VANIJANONTA, S.; THAIRUNGROJ, M.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; WATANABE, S.; ITO, A. Cysticercosis: IgG-ELISA evaluations of peak1 antigen and <30 kDa antigen of delipidized extract of *Taenia solium* metacestodes. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine of Public Health**, v. 35, n. 1, p. 1-9, 2004.

DEL BRUTTO, O. H.; WADIA, N. H.; TSANG, V. C. W.; NASH, T. E.; SCHANTZ, P. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. **Journal of Neurological Science**, v. 142, n. 1-2, p. 1-6, 1996.

DEL BRUTTO, O. H.; RAJSHEKHAR, V.; WHITE, A. C. Jr.; TSANG, V. C. W.; NASH T. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; SCHANTZ, P. M.; EVANS, C. A. W.; FLISSER, A.; CORREA, D.; BOTERO, D.; ALLAN, J. C.; SARTI, E. M; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; GARCÍA, H. H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, v. 57, n. 2, p. 177-183, 2001.

DELGADO-AZAÑERO WA, MOSQUEDA-TAYLOR A, CARLOS-BREGNI R, DEL MURO-DELGADO R, DÍAZ-FRANCO MA, CONTRERAS-VIDAURRE E. Oral cysticercosis: a collaborative study of 16 cases. **Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 103, n. 4, p. 528-533, 2007.

DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 79-86, 2003.

DORNY, P.; BRANDT, F.; GEERTS, S. Immunodiagnostic approaches for detecting *Taenia solium*. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 6, p. 259-260, 2004.

DUMAS, M.; GRUNITZKY, K.; BELO, M.; DABIS, F.; DENIAU, M.; BOUTEILLE, B.; KASSANKOGNO, Y.; CATANZANO, G.; ALEXANDRE, M. P. Cysticercosis and neurocysticercosis: epidemiological survey in North Togo. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 83, n. 2, p. 263-274, 1990.

- EDDI, C.; NARI, A.; AMANFU, W. *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 145-148, 2003.
- EDDI, C.; KATALIN, B.; JUAN, L.; WILLIAM, A.; ANDREW, S.; DANIELA, B.; JOSEPH, D. Veterinary public health activities at FAO: cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S305-S308, 2006.
- ELIAS, F. M.; MARTINS, M. T.; FORONDA, R.; JORGE, W. A.; ARAÚJO, N. S. Oral cysticercosis: case report and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 2, p. 95-98, 2005.
- EOM, K. S.; JEON, H. K. *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: Genetic divergence estimated from their mitochondrial genomes. **Experimental Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 58-61, 2006.
- ESTEVEZ, F. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; CARVALHO, A. C. F. B. Epidemiologic survey of teniasis in Health and Family Program in Uberaba, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 530-531, 2005.
- FAÇANHA, M. C. Cysticercosis' admissions in public health hospitals: Ceará State distribution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 484-487, 2006.
- FALAVIGNA-GUILHERME, A. L.; SILVA K.; ARAÚJO, S. M.; TOBIAS, M. L.; FALAVIGNA, D. M. L. Cysticercosis in animals of Sabáudia, Paraná State. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 950-951, 2006.
- FAN, P. C.; MA, Y. X.; KUO, C. H.; CHUNG, W. C. Survival of *Taenia solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4 C. **The Journal of Parasitology**, v. 84, n. 1, p.174-175, 1998.
- FERREIRA, A. P.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, P. M.; SASAKI, A. T.; FERREIRA, W.; LIVRAMENTO, J. A. Hemagglutination test for the diagnosis of human neurocysticercosis: development of a stable reagent using homologous and heterologous antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 29-33, 1997.
- FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L. W.; ONYANGO-ABUJE, J. A.; GARATE, T.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E. *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 83-94, 2003.
- FERRER, E.; BONAY, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L. M.; DÁVILA, I.; CORTÉZ, M. M.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 90-100, 2007a.

FERRER, E.; GONZÁLEZ, L. M.; MARTÍNEZ-ESCRIBANO, J. A.; GONZÁLEZ-BARDERAS, M. E.; CORTÉZ, M. M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 3, p. 517-525, 2007b.

FLEURY, A.; BELTRAN, C.; FERRER, E.; GARATE, T.; HARRISON, L. J. S.; MICHAEL, R.; PARKHOUSE, E.; GARCIA, E.; FRAGOSO, G.; COSTA-CRUZ, J.; BIONDI, G.; AGAPEJEV, S.; SCIUTTO, E. Application of synthetic peptides to diagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 12, p.1124-1130, 2003.

FLEURY, A.; MORALES, J.; BOBES, R. J.; DUMAS, M.; YÁNEZ, O.; PIÑA, J.; CARRILLO-MEZO, R.; MARTÍNEZ, J. J.; FRAGOSO, G.; DESSEIN, A.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 6, p. 551-558, 2006.

NASCIMENTO E. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D.P.; MELO A.L.; GENARO O.; LINARDI P.M. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 428.

FLISSER, A.; CORREA, D.; EVANS, C. A. W. *Taenia solium* cysticercosis: New and revisited immunological aspects. In: SINGH, G.; PRABHAKAR, S. **Taenia solium cysticercosis: From basic to clinical science**. Wallingford: CABI Publishing, 2002, p. 480.

FLISSER, A.; SARTI, E.; LIGHTOWLERS, M.; SCHANTZ, P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 43-51, 2003.

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

FLISSER, A.; RODRÍGUEZ-CANUL, R.; WILLINGHAM, A. L. III. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 4, p. 283-292, 2006.

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

GARCIA, E.; SOTELO, J. A new complement fixation test for the diagnosis of neurocysticercosis in cerebrospinal fluid. **Journal of Neurology**, v. 238, n. 7, p. 379-382, 1991.

GARCIA, H. H.; DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. **Lancet Neurology**, v. 4, n. 10, p. 653-661, 2005.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; EVANS, C. A.W.; GILMAN, R. H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, v. 362, n. 9383, p. 547-556, 2003a.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GAVIDIA, C.; FALCON, N.; BERNAL, T.; VERASTEGUI, M.; RODRIGUEZ, S.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. Seroincidence of porcine *T. solium* infection in the Peruvian highlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 57, n. 4, p. 227-236, 2003b.

GARCIA, H. H.; DEL BRUTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE, A. C. Jr.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 1, p. 3-9, 2005.

GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; DEL BRUTO, O. H.; TSANG, V. C. W.; LLANOS-ZAVALAGA, F.; GONZALVEZ, G.; ROMERO, J.; GILMAN, R. H. Strategies for the elimination of taeniasis/cysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 262, n. 1-2, p. 153-157, 2007.

GARCIA-NOVAL, J.; ALLAN, J. C.; FLETES, C.; MORENO, E.; DE MATA, F.; TORRES-ALVAREZ, R.; SOTO DE ALFARO, H.; YURRITA, P.; HIGUEROS-MORALES, H.; MENCOS, F.; CRAIG, P. S. Epidemiology of *Taenia solium* teniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 3, p. 282-289, 1996.

GARG, R.; SRIVASTAVA, J. K.; PAL, A.; NAIK, S.; DUBE, A. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylactic potential in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 23, n. 9, p. 1189-1196, 2005.

GAUCI, C.G.; LIGHTOWLERS, M.W. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium*, with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 112, n. 2, p. 173-181, 2001.

GEKELER, F.; EICHENLAUB, S.; MENDOZA, E. G.; SOTELO, J.; HOELSCHER, M.; LÖSCHER, T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 227-229, 2002.

GEMMELL, M. A. A critical approach to the concepts of control and eradication of echinococcosis/hydatidosis and taeniasis/cysticercosis. **International Journal for Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 465-472, 1987.

GEVORKIAN, G.; MANOUTCHARIAN, K.; LARRALD, C.; HERNANDEZ, M.; ALMAGRO, J.C.; VIVEROS, M.; SOTELO, J.; GARCÍA, E.; SCIUTTO, E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. **Immunology Letters**, v. 49, p. 185-189, 1996.

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

- GOMES, I.; VEIGA, M.; EMBIRUÇU, E. K.; RABELO, R.; MOTA, B.; MEZA-LUCAS, A.; TAPIA-ROMERO, R.; CARRILLO-BECERRIL, B. L.; ALCANTARA-ANGUIANO, I.; CORREA, D.; MELO, A. Taeniasis and cysticercosis prevalence in a small village from northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 2-A, p. 219-223, 2002.
- GONZALEZ, A. E.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. W. Control of *Taenia solium*. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 103-109, 2003.
- GONZÁLEZ, L. M.; FERRER, E.; SPICKETT, A.; MICHAEL, L. M.; VATTA, A. F.; GÁRATE, T.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M. The *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus* spp. is immunogenic and 97% identical to its *Taenia solium* homologue. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1541-1549, 2007.
- GRUNITZKY, E.; BALOGOU, A. K.; M'BELLA, M.; BELO, M.; SADZO, A.; BOUTEILLE, B.; DUMAS, M. Cysticercosis in patients with neurologic diseases in hospital milieu in Lome, Togo. **Annales de Médecine Interne**, v. 146, n. 6, p. 419-422, 1995.
- HANCOCK, K.; PATTABHI, S.; GREENE, R. M.; YUSHAK, M. L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, J. W.; LEVINE, M. Z.; TSANG, V. C. W. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnosis for cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 115-124, 2004.
- HAWK, M. W.; SHAHLAIE, K.; KIM, K. D.; THEIS, J. H. Neurocysticercosis: a review. **Surgical Neurology**, v. 63, n. 2, p. 123-132, 2005.
- HEATH, S.; CHANCE, M. L.; HOMMEL, M.; CRAMPTON, J. M. Cloning of a gene encoding the immunodominant surface antigen of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 23, n. 3, p. 211-222, 1987.
- HOBERG, E. P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 859-866, 2002.
- HOBERG, E. P. Phylogeny of *Taenia*: species definitions and origins of human parasites. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S23-S30, 2006.
- HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal of Public Health Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-291, 1934.
- HOUINATO, D.; RAMANANKANDRASANA, B.; ADJIDÉ, C.; MELAKU, Z.; JOSSE, R.; AVODÉ, G.; DUMAS, M.; BOUTEILLE, B. Seroprevalence of cysticercosis in Bénin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p. 621-624, 1998.

HUERTA, M.; SCIUTTO, E.; GARCÍA, G.; VILLALOBOS, N.; HERNÁNDEZ M.; FRAGOSO, G.; DÍAZ, J.; DÍAZ, A.; RAMÍREZ, M.; LUNA, S.; GARCÍA J.; AGUILAR, E.; ESPINOZA, S.; CASTILLA, G.; BOBADILLA, J. R.; AVILA, R.; JOSÉ M. V.; LARRALDE, C.; de ALUJA, A. S. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 209–219, 2000.

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

ISHIDA, M. M. I.; PERALTA, R. H. S.; LIVRAMENTO, J. A.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot assay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 343-346, 2006.

ITO, A.; CRAIG, P. S. Response to Dorny et al.: immunodiagnostic approaches for detecting *Taenia solium*. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 6, p. 260-261, 2004.

ITO, A.; NAKAO, M.; WANDRA, T. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. **The Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1918-1920, 2003.

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

ITO, A.; YAMASAKI, H.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; OKAMOTO, M.; SATO, M. O.; NAKAYA, K.; MARGONO, S. S.; IKEJIMA, T.; KASSUKU, A. A.; AFONSO, S. M. S.; ORTIZ, W.B.; PLANCARTE, A.; ZOLI, A.; GEERTS, S.; CRAIG, P. S. Multiple genotypes of *Taenia solium* – ramifications for diagnosis, treatment and control. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 95-101, 2003a.

ITO, A.; URBANI, C.; JIAMIN, Q.; VUITTON, D. A.; DONGCHUAN, Q.; HEATH, D. D.; CRAIG, P. S.; ZHENG, F.; SCHANTZ, P. M. Control of echinococcosis and cysticercosis: a public health challenge to international cooperation in China. **Acta Tropica**, v. 86, n. 1, p. 3-17, 2003b.

IUDICI NETO, F.; PIANETTI-FILHO, G.; ARAÚJO, R. N.; NASCIMENTO, E. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis by using semi-purified scolex antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 163-169, 2007.

JAY, A.; DHANDA, J.; CHIODINI, P. L.; WOODROW, C. J.; FARTHING, P. M.; EVANS, J.; JAGER, H. R. Oral cysticercosis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 4, p. 331–334, 2007.

- KO, R.C.; NG, T.F. Specific of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. **Parasitology Research**, v. 84, n. 7, p. 565-569, 1998.
- KONG, Y.; KANG, S. Y.; CHO, S. Y.; MIN, D. Y. Cross-reacting and specific antigens components in cystic fluid from metacestodes of *Echinococcus grannulosos* and *Taenia solium*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 27, n. 2, p. 131-139, 1989.
- KUMAR, G. R. Diagnosis criteria for neurocysticercosis: some modifications are needed for Indian patients. **Neurology India**, v. 52, n. 2, p. 171-177, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 680-685, 1970.
- LARRALDE, C.; MONTOYA, R. M.; SCIUTTO, E.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; COLTORTI, E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 3, p. 282-290, 1989.
- LIGHTOWLERS, M. W. Vaccines for prevention of cysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 129-135, 2003.
- LIGHTOWLERS, M. W. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. **Parasitology**, v. 133, p. S27-S42, 2006a.
- LIGHTOWLERS, M. W. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: Foundations in taeniid cestode immunology. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S39-S43, 2006b.
- LIMA, J. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; GARCIA, L. V.; LEITE, J. P. Neuron-specific enolase in patients with neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 217, n. 1, p. 31-35, 2004.
- LONARDONI, M. V.; BERTOLINI, D. A.; SILVEIRA, T. G.; ARRAES S. M.; SVIDZINSKI T. I.; CARDOSO R. F.; GOMES M. L.; DIAS M. L.; VISENTAINER J. E.; MISUTA N. M.; RAMOS M.; SIQUEIRA V. L. Frequency of anti-Cysticercus cellulosae antibodies in individuals from five counties in the southern region of Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 3, p. 273-279, 1996.
- LOWRY, V. H.; ROSEBROUCH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MACEDO, H. W.; PERALTA, R. H. S.; CIPRIANO, A.; SARMENTO, M.R.; VAZ, A. J.; PERALTA, J. M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 93-103, 2002.

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, n. 11, p. 1369–1376, 2007.

MARETTI, M. A. Neurocysticercosis: a study of 177 cases from São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 57, n. 4, p. 1063, 1999.

MCMANUS, D. P. Molecular discrimination of taeniid cestodes. *Parasitology International*, v. 55, Supplement 1, p. S31-S37, 2006.

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, n. 1, p. 124-131, 2005.

MENDES, E. C.; SILVA, S. S.; FONSECA, E. A. LA TERZA; SOUZA, H. R. R.; CARVALHO, R. W. Human neurocysticercosis in Baixada Fluminense, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 4, p. 1058-1062, 2005.

MONTENEGRO, T.; GILMAN, R.; CASTILLO, R.; TSANG, V.; BRANOT, J.; GUEVARA, A.; SANABRIA, H.; VERASTEGUI, M.; STERLING, C.; MIRANDA, E. The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Hymenolepis nana*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 4, p. 327-334, 1994.

MONTRESOR, A.; PALMER, K. Taeniasis/cisticercosis trend worldwide and rationale for control. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S301-S303, 2006.

MORAES, R. G. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrogiloidíase no Brasil. **Revista do Serviço Especial de Saúde Pública**, v. 1, p. 507-624, 1948.

MORAKOTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMOSONTHI, W.; KHAMBOONRUANG, C. Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of NC. **Southeast Asian Journal of Tropical and Medical Public Health**, v. 23, n. 1, p. 77-81, 1992.

MURRAY, P. J.; SPITHILL, T. W.; HANDMAN, E. Characterization of integral membrane proteins of *Leishmania major* by Triton X-114 fractionation and analysis of vaccination effects in mice. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 7, p. 2203-2209, 1989.

NASCIMENTO E. Teníase e Cisticercose. In: NEVES, D.P.; MELO A.L.; GENARO O.; LINARDI P.M. **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 428.

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

- NGUEKAM, J. P.; ZOLI, A. P.; ZOGO, P. O.; KAMGA, A. C. T.; SPEYBROECK, N.; DORNY, P.; BRANDT, J.; LOSSON, B.; GEERTS, S. A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. **Tropical Medicine and International Health**, v. 8, n. 2, p.144-149, 2003.
- NUNES, C. M.; BIONDI, G. F.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J. Comparative evaluation of an indirect ELISA test for diagnosis of swine cysticercosis employing antigen from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. **Veterinary Parasitology**, v. 93, n. 2, p. 135-140, 2000.
- OLIVEIRA, H. B.; RODRIGUES, R. M.; BARCELOS, I. S. C.; SILVA, L. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Anti-*Taenia solium* metacestode IgG antibodies in serum samples from inhabitants of a Central-Western region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 49-52, 2006.
- OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; CABRAL, D. D.; COSTA-CRUZ, J. M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 1007-1113, 2007.
- ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. Epidemiologia y control de la teniasis/cisticercosis em America Latina. OPS/OMS, versión 3.0, 1994.
- PAL, D. K.; CARPIO A.; SANDER J. W. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 68, n. 2, 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, n. 1, p. 190-193, 2002.
- PAWLOWSKI, Z.; ALLAN, J.; SARTI, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1221-1232, 2005.
- PFUETZENREITER, M. R.; ÁVILA-PIRES, F. D. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciência Rural**, v. 30, n. 3, p. 541-548, 2000.
- PIERPONT, J. W.; LAGUNA, J. F.; SEEGER, J. F. Tuberculosis meningitis and neurocysticercosis: clinical, laboratory and radiological features. **Neurologist**, v. 6, n. 1, p. 44-57, 2000.
- PLANCARTE, A.; FLISSER, A.; GAUCI, C. G.; LIGHTOWLERS, M. W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 643-647, 1999.

PRABHAKARAN, V.; RAJSHEKHAR, V.; MURRELL, K.D.; OOMMEN, A. *Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 8, p. 478-484, 2004.

PREUX, P. M.; DRUET-CABANAC, M. Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan África. **Lancet of Neurology**, v. 4, n. 1, p. 21-31, 2005.

PROAÑO-NARVAEZ J V.; MEZA-LUCAS, A.; MATA-RUIZ, O.; GARCÍA-JERÓNIMO, R. C.; CORREA, D. Laboratory Diagnosis of Human Neurocysticercosis: Double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2115-2118, 2002.

PUSHKER, N.; BAJAJ, M. S.; BALASUBRAMANYA, R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. **Journal of Infection**, v. 51, n. 5, p. 245-248, 2005.

RAJSHEKHAR, V.; JOSHI, D. D.; DOANH, N. Q.; VAN DE, N.; XIAONONG, Z. *Taenia solium*, taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 53-60, 2003.

REIS, O. D.; MUNDIM, M. J. S.; CABRAL, D. D.; COSTA-CRUZ, J. M. Cisticercose bovina: 15 anos de ocorrência em animais abatidos em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil - 1979 a 1993. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 43, p. 33-35, 1996.

REIS, O. D.; RAGHIANTE, F. Cisticercose bovina: Tendência da doença em animais abatidos em um frigorífico de Uberlândia, MG, sob inspeção federal, 1994-1998. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 70, p. 20-22, 2000.

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

ROCA, C.; GASCÓN, J.; FONT, B.; PUJOL, T.; VALLS, M. E. Neurocysticercosis and population movements: analysis of 23 imported cases in Spain. **European Journal of Clinical and Microbiology Diseases**, v. 22, n. 6, p. 382-384, 2003.

RODRIGUEZ-CANUL, R.; FRASER, A.; ALLAN, J.C.; DOMINGUEZ-ALPIZAR, J. L.; ARGAEZ-RODRIGUEZ, F.; CRAIG, P. S. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state. Mexico. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 57-67, 1999.

RODRIGUEZ-HIDALGO, R.; BENITEZ-ORTIZ, W.; PRAET, N.; SAA, L. R.; VERCRUYSSSE, J.; BRANDT, J.; DORNY, P. Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 779-782, 2006.

ROGERS, M. V.; DAVERN, K. M.; SMYTHE, J. A.; MITCHELL, G. F. Immunoblotting analysis of the major integral membrane protein antigens of *Schistosoma japonicum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 77-87, 1988.

ROMÁN, G.; SOTELO, J.; DEL BRUTTO, O.; FLISSER, A.; DUMAS, M.; WADIA, N.; BOTERO, D.; CRUZ, M.; GARCIA, H.; de BITTENCOURT, P. R. M.; TRELLES, L.; ARRIAGADA, C.; LORENZANA, P.; NASH, T. E.; SPINA-FRANÇA, A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 3, p. 399-406, 2000.

SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. Recombinant antigens for serodiagnosis of cysticercosis and echinococcosis. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S69-S73, 2006.

SALINAS P, SANDOVAL L, RUGIERO E, CONTRERAS MC. Diagnosis of human neurocysticercosis by ELISA-IgG using a purified antigen. **Boletín Chileno de Parasitología**, v. 51, n. 3-4, p. 85-90, 1996.

SARTI, E.; RAJSHEKHAR, V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 137-143, 2003.

SATO, M. O.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; YAMASAKI, H.; NAKAYA, K.; ITO, A. Evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and recombinant antigens in the serologic detection of human and swine cysticercosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 12, p. 1783-1790, 2006.

SCHANTZ, P. M. Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis and cysticercosis. **Parasitology International**, Supplement 1, v.55, p. S7-S13, 2006.

SCHANTZ, P. M.; WILKINS, P. P.; TSANG, V. C. W. Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a major public health problem. In: SCHELD, W. M.; CRAIG, W. A.; HUGHES, J. M. **Emerging Infections**. 2. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 213-242, 1998.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LACLETTE, J. P.; SOTELO, J.; ALUJA, A.; VARGAS, L.; LARRALDE, C. *Taenia solium* disease in human and pigs: an ancient parasitosis rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1875-1890, 2000.

SCIUTTO, E.; CHAVARRIA, A.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; LARRALDE, C. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 621-636, 2007.

SCHEEL, C. M.; KHAN, A.; HANCOCK, K.; GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; TSANG, V. C. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kd proteins: comparison of assay formats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 4, p. 771-776, 2005.

SHARMA, S. K.; GUPTA, C.; DWIVEDI, V.; MISRA-BHATTACHARYA, S.; MOHAMMAD, O. Prophylactic potential of liposomized integral membrane protein of *Plasmodium yoelii nigeriensis* against blood stage infection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 2103-2111, 2007.

SHIGUEKAWA, K. Y.; MINEO, J. R.; MOURA, L. P.; COSTA-CRUZ, J.M. ELISA and Western Blotting test in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 6, p. 443-449, 2000.

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, n. 4, p. 229-231, 2002.

SIMAC, C.; ANDRIANTSIMAHAVANDY, A.; ESTERRE, P.; MICHAULT, A. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot for the diagnosis and monitoring of neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v. 81, n. 2, p. 132-136, 1995.

SMYTHE, J.; COPPEL, R. L.; BROWN, G. V.; KEMP, D. J.; ANDERS, R. F. Identification of novel integral membrane proteins of *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 5195-5199, 1988.

SOTELO, J.; DEL BRUTTO, O. H. Brain Cysticercosis. **Archives of Medical Research**, v. 31, n. 1, p. 3-14, 2000.

SOTELO, J.; ROSAS, N.; PALENCIA, G. Freezing of infested pork muscle kills cysticerci. **J The journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 7, p. 893-894, 1986.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. Cysticercosis of the central nervous system and cerebrospinal fluid: immunodiagnosis of 1573 patients in 63 years (1929-1992). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 51, n. 1, p. 16-20, 1993.

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

TAKAYANAGUI, O. M.; ODASHIMA, N. S. Clinical aspects of neurocysticercosis. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S111-S115, 2006.

TAKAYANAGUI, O. M.; CASTRO E SILVA A. A.; SANTIAGO, R. C.; ODASHIMA, N. S.; TERRA, V. C.; TAKAYANAGUI, A. M. Notificação compulsória da cisticercose em Ribeirão Preto - SP. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 54, n. 4, p. 557-564, 1996.

TERRAZA, S.; PUJOL, T.; GASCÓN, J.; CORACHÁN, M. Neurocysticercosis: an imported disease? **Medicina Clinica**, v. 116, n. 7, p. 261-263, 2001.

TOLEDO, A.; FRAGOSO, G.; ROSAS, G.; HERNANDEZ, M.; GEVORKIAN, G.; LOPEZ-CASILLAS, F.; HERNANDEZ, B.; ACERO, G.; HUERTA, M.; LARRALDE, C.; SCOUTTO, E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1766-1773, 2001.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TREVISOL-BITTENCOURT P. C.; da SILVA, N. C.; FIGUEREDO R. Prevalence of neurocysticercosis among epileptic in-patients in the west of Santa Catarina - southern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 1, p. 53-58, 1998.

TSANG, V.C.W.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. Enzyme-linked immuno electrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 1, p. 50-59, 1989.

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

VERASTEGUI, M.; GILMAN, R.; GONZALES, A.; GARCIA, H.; GAVIDIA, C.; FALCON, N.; BERNAL, T.; ARANA, Y.; TSANG, V. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. **Veterinary Parasitology**, v. 108, n. 1, p. 49-62, 2002.

WAIKAGUL, J.; DEKUMYOY, P.; ANANTAPHRUTI, M. T. Taeniasis, cysticercosis and echinococcosis in Thailand. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S175 – S180, 2006.

WANG, C. Y.; ZHANG, H. H.; GE, L. Y. 1992. A MAb-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis. **Hybridoma**, v. 11, n. 6, p. 825-827, 1992.

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.

YAMASAKI, H.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; NAKAYA, K.; SATO, M. O.; ITO, A. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. **Parasitology International**, v. 55, Supplement 1, p. S81 – S85, 2006.

YANCEY, L. S.; DIAZ-MARCHAN, P. J.; WHITE, A. C. Cysticercosis: recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, n. 1, p. 39-47, 2005.

YODEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, n. 1, p. 32-35, 1950.

ZHENG, Y.; CAI, X.; LUO, X.; HU, Z.; JING, Z. Characterization of a new gene (SLC10) with a spliced leader from *Taenia solium*. **The Veterinary Journal**, (doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.020), 2007.

ZOLI, A.; SHEY-NJILA, O.; ASSANA, E.; NGUEKAM, J. P.; DORNY, P.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. **Acta Tropica**, v. 87, n. 1, p. 35-42, 2003.