

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE METACESTÓDEOS DE *Taenia saginata* NA  
NEUROCISTICERCOSE HUMANA: ANÁLISE PROTEÔMICA E APLICAÇÃO EM  
PLATAFORMAS IMUNODIAGNÓSTICAS**

**DANIELA DA SILVA NUNES**

Uberlândia

Fevereiro – 2017

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

**FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE METACESTÓDEOS DE *Taenia saginata* NA  
NEUROCISTICERCOSE HUMANA: ANÁLISE PROTEÔMICA E APLICAÇÃO EM  
PLATAFORMAS IMUNODIAGNÓSTICAS**

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

**Daniela da Silva Nunes**

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

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

Uberlândia  
Fevereiro – 2017

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

---

- N972f Nunes, Daniela da Silva, 1986  
2017 Frações antigênicas de metacestódeos de *Taenia saginata* na neurocisticercose humana: análise proteômica e aplicação em plataformas imunodiagnósticas / Daniela da Silva Nunes. - 2017.  
103 p. : il.
- Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.  
Coorientador: Jair Pereira da Cunha Júnior.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Análise cromatográfica - Teses. 3. Espectrometria de massa - Teses. 4. Antígenos - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Cunha Júnior, Jair Pereira da, 1974-. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.



**Daniela da Silva Nunes**

**“FRAÇÕES ANTIGÊNICAS DE METACESTÓDEOS DE *Taenia saginata* NA NEUROCISTICERCOSE HUMANA: ANÁLISE PROTEÔMICA E APLICAÇÃO EM PLATAFORMAS IMUNODIAGNÓSTICAS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 17 de fevereiro de 2017.

Profa. Dra. Caris Maroni Nunes  
UNESP/Campus Araçatuba

Profa. Dra. Renata Pereira Alves-Balvedi  
UFTM/Campus Iturama

Dra. Vanessa da Silva Ribeiro  
UFG/Campus Catalão

Prof. Dr. Henrique Tomaz Gonzaga  
PMU

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz – orientadora

ICBIM/UFU

*“O que tem que ser, tem muita força”.*

Guimarães Rosa

*“Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência  
do que qualquer outro talento”.*

Isaac Newton

## **Dedicatória**

*Aos meus amados pais,*

**Iva Lúcia Pereira da Silva Nunes e Marleno Francisco Nunes**, por minha vida e pela oportunidade que me deram de estudar. Meus exemplos!

*À minha irmã,*

**Juliana da Silva Nunes**, por entender minha ausência e sempre apoiar minhas escolhas.

*Ao meu amor,*

**Ludiel Costa Justino**, você foi parte de mim nessa trajetória. Seu apoio me proporcionou força a cada dia. Caminharemos sempre juntos!

*Em especial dedico essa tese à minha afilhada,*

**Maria Tereza Nunes e Silva**, você trouxe luz, alegria e amor em nossas vidas!

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

## Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, por me proteger, colocar pessoas especiais em minha vida, e me dar força para vencer todos os obstáculos.

À minha família, pelo incentivo que sempre me dão.

À Universidade Federal de Uberlândia por todos os títulos concedidos, pela oportunidade de estudo gratuito e de qualidade. Em especial ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, por todo aprendizado e pela minha formação.

À Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, pela orientação, oportunidade e dedicação. Muito obrigada pela confiança ao longo desses nove anos de Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, em especial pela autonomia que me concedeu durante a execução do trabalho. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e convivência! Sua equipe é especial, que possamos continuar a parceria!

Ao Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior pela coorientação, disponibilidade, conselhos e ideias compartilhadas. Muito obrigada pela parceria indispensável, a qual tornou nossos estudos possíveis.

Ao Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, além da participação na banca de defesa, pela amizade, auxílio técnico e metodológico, muito obrigada por todos os ensinamentos! Foi gratificante trabalhar e conviver com você ao longo desses anos, esse trabalho foi possível graças à sua ajuda!

À Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, por avaliar a tese na banca de defesa, além da disponibilidade sempre imediata. Obrigada pelos ensinamentos e convívio desde o início da minha vida profissional.

Aos Professores Dr. Jonny Yokosawa, Dra. Maria Aparecida de Souza, Dra. Mônica Camargo Sopelete, pelas considerações na banca de qualificação.

Às Professoras Dra. Cáris Maroni Nunes e Dra. Renata Pereira Alves-Balvedi, e aos membros suplentes Dra. Juliana Silva Miranda e Dra. Caroline Martins Mota pela participação e sugestões na banca de defesa.

À Universidade Nacional Autónoma do México, ao Instituto de Investigações Biomédicas, pelo acolhimento durante o doutorado sanduíche. Em especial a Dra. Edda

Lydia Scιutto Conde, Dra. Julieth Marcela Diaz Masmela, Dr. Raúl José Bobes Ruíz, e Dra. Rutilia Marisela Hernández González, pelos ensinamentos, receptividade, e oportunidade única de aprendizado.

À minha amiga Maria Fernanda Torregrosa Flores. Fer, Deus coloca pessoas em nossas vidas para nos ajudar quando necessitamos! Obrigada por me acolher durante minha estadia no México e pela amizade que permaneceu!

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

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

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro. Em especial, à CAPES pela bolsa de doutorado concedida e participação no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)/CAPES, processo nº 99999.010876/2014-06, pela oportunidade única de realização do doutorado sanduíche no México.

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul/Campus de Chapadão do Sul (CPCS), pela compreensão durante o término do doutorado.

Aos que estiveram presentes, de forma direta ou indireta, no decorrer destes quatro anos, por fazerem cada momento valer a pena e tornar essa trajetória possível! Obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	14
1.1 Aspectos morfológicos de <i>Taenia</i> sp.	14
1.2 Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose	15
1.3 Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose	17
1.4 Patogenia, interação parasito-hospedeiro e resposta imune	21
1.5 Diagnóstico da neurocisticercose humana	23
1.5.1 Antígenos hererólogos	25
1.5.2 Antígenos fracionados	26
1.5.3 Imunossensores	29
<b>2. OBJETIVOS</b>	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	34
3.1 Aspectos éticos	34
3.2 Caracterização dos grupos de estudo	34
3.2.1 Amostras de soro: cromatografia de gel filtração	36
3.2.1.1 Fração antigênica F1	36
3.2.1.2 Fração antigênica F2	36
3.2.2 Amostras de soro e líquor: cromatografia de troca iônica	37
3.2.3 Amostras de líquor: Imunossensor	37
3.3 Obtenção das formas metacestódeas de <i>T. saginata</i> e do líquido de vesícula de <i>T. solium</i>	38
3.4 Preparação do extrato salino de metacestódeos de <i>T. saginata</i> e do líquido de vesícula de <i>T. solium</i>	38
3.5 Cromatografias do extrato salino de metacestódeos de <i>T. saginata</i>	39
3.5.1 Cromatografia de gel filtração	39
3.5.2 Cromatografia de troca iônica	40
3.6 Análise do perfil eletroforético dos extratos antigênicos em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) unidimensional (1D) e bidimensional (2D)	41
3.6.1 Eletroforese unidimensional (1D)	41
3.6.2 Eletroforese bidimensional (2D)	42
3.7 Testes sorológicos	44
3.7.1 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i>	44
3.7.1.1 ES e fração antigênica F1	44
3.7.1.2 ES, LV e frações antigênicas CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2	45
3.7.2 Immunoblotting 1D e 2D para detecção de anticorpos IgG anti -metacestódeos de <i>T. solium</i>	46
3.8 Espectrometria de massas, pesquisa no banco de dados, identificação das proteínas e predição de epítópos	48

3.9 Desenvolvimento do imunossensor	49
3.10 Análise estatística	50
3.11 Normas de biossegurança	52
<b>4. RESULTADOS</b>	52
4.1 Frações antigênicas de metacestódeos de <i>T. saginata</i> obtidas por cromatografia de gel filtração	52
4.1.1 Análise do perfil eletroforético	52
4.1.2 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> por ELISA	56
4.1.2.1 ES e fração antigênica F1	56
4.1.2.2 ES e fração antigênica F2	58
4.1.3 <i>Immunoblotting</i> 1D para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i>	60
4.1.3.1 ES e fração antigênica	60
4.2 Frações antigênicas de metacestódeos de <i>T. saginata</i> obtidas por cromatografia de troca iônica	62
4.2.1 Análise do perfil eletroforético	62
4.2.2 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> por ELISA	65
4.2.2.1 ES, LV e frações antigênicas CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2	65
4.2.3 <i>Immunoblotting</i> 1D e 2D para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de <i>T. solium</i> em amostras de líquor	68
4.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS) e predição de epítopos	70
4.3.1 Fração antigênica F1 obtida por cromatografia de gel filtração	70
4.3.2 Fração antigênica F2 obtida por cromatografia de gel filtração	72
4.3.3 Fração antigênica DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica	74
4.4 Desenvolvimento do imunossensor	77
<b>5. DISCUSSÃO</b>	79
<b>6. CONCLUSÃO</b>	88
<b>REFERÊNCIAS</b>	89
<b>ANEXO</b>	103

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1.** Caracterização protéica das frações obtidas por técnicas cromatográficas do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* identificadas por spectrometria de massas e sujeitos a busca no banco de dados para gênero *Taenia*.

76

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** (A) Perfil cromatográfico do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* obtido por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resoultion, GE Healthcare, EUA), leitura realizada pelo método de Bradford (595nm) Blank – tampão de equilíbrio. (B) Perfil eletroforético do ES e das amostras representativas obtidas por cromatografia de gel filtração (tubos 11-28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).

54

**Figura 2.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e frações obtidas após cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resoultion, GE Healthcare, EUA). Frações (F) definidas de acordo com o perfil observado nos tubos (Figura 1). F1 – tubos 22 ao 26, F2 – tubos 28 ao 34, SDS-PAGE 15% e 17%, corados por azul de Coomassie. PM - padrão de peso molecular (kDa).

55

**Figura 3.** (A) ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=45), outras infecções parasitárias (G2; n=65) e indivíduos saudáveis (G3; n=50), utilizando o extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e a fração F1 obtida por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resoultion, GE Healthcare, EUA), Linha pontilhada indica o cut-off (Índice ELISA >1). (B) Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (cut-off), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (area under curve; AUC) e razão de verossimilhança (likelihood ratio; LR) utilizando o ES e a fração F1 obtida por cromatografia de gel filtração.

57

**Figura 4.** (A) ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=50), outras infecções parasitárias (G2; n=55) e indivíduos saudáveis (G3; n=50), utilizando o extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e a fração F2 obtida por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resoultion, GE Healthcare, EUA), Linha pontilhada indica o cut-off (Índice ELISA >1). (B) Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (cut-off), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a

59

curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) utilizando o ES e a fração F2 obtida por cromatografia de gel filtração.

**Figura 5.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em pool de amostras de soro de pacientes com NC (G1) e indivíduos saudáveis (G3), utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e a fração antigênica F1, obtida por cromatografia de gel filtração. Picos de intensidade, indicam as bandas detectadas pelo programa Image J (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA). PM - padrão de peso molecular (kDa).

61

**Figura 6.** Perfil eletroforético do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), e das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS1, DEAES1 e DEAES2), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).

63

**Figura 7.** Perfil eletroforético 1D e 2D da fração DEAES2 do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose. **(A)** Gel 1D, em SDS-PAGE 4-12%, corado por Azul de Coomassie. **(B)** Gel 2D, em SDS- PAGE 12%, analisado pelo PDQuest (Bio-Rad) e corado por nitrato de prata. Aproximadamente 70 µg de proteína foram utilizadas para reidratar a tira de IPG (Gradiente de pH imobilizado) de 7 cm, não-linear, pH 3–10. Um total de 24 spots foram identificados e numerados (1-24). PM - padrão de peso molecular (kDa).

64

**Figura 8.** Curvas ROCs indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*: LR+ e LR-) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro, utilizando líquido de vesícula (LV), extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e suas frações obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).

66

**Figura 9.** Curvas ROCs indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*: LR+ e LR-) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de líquor, utilizando líquido de vesícula (LV) extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e suas frações obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).

67

**Figura 10.** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro e líquor de pacientes com NC (G1; n=68) e outras

68

desordens neurológicas (G2; n=30), utilizando a fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica. Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1). \*\*\* P < 0,001.

**Figura 11.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *Taenia solium*, utilizando a fração antigênica DEAES2 de metacestódeos de *Taenia saginata*, obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose. (A) *Immunoblotting* utilizando pool de líquor de pacientes com NC (1), indivíduos falsos positivos (2) e indivíduos com outras desordens neurológicas (3), em gel unidimensional gradiente (SDS-PAGE), 4-12%. (B) *Immunoblotting* utilizando pool de líquor de pacientes com NC (1) com outras desordens neurológicas (2), em gel bidimensional (2D-PAGE), 12%. PM - padrão de peso molecular (kDa).

69

**Figura 12.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração F1 obtida por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100) (A) enolase (*Taenia Multiceps*) e (B) calreticulina (*Taenia solium*). (A.1 e B.1) Predição de epítópos lineares de células B pelo *BepiPred*. Resíduos de aminoácidos são coloridos em amarelo no gráfico quando atingem escores acima do limiar (*threshold*; 0,35), o eixo X corresponde às posições dos resíduos na sequência (*position*) e eixo Y *score*. (A.2 e B.2) Estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa, da estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*), onde epítópos de célula B preditos são mostrados em amarelo e epítópos não preditos em verde. (A.3 e B.3) Sequência da proteína identificada com os determinantes antigênicos (amarelo) preditos para células B.

71

**Figura 13.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração F2 obtida por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100) (A) mioglobina (*Bos taurus*) e (B) glicoproteína de 8 kDa (*Taenia multiceps*). (A.1) sequência da proteína identificada e (A.2) estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*). (B.1) Predição de epítópos lineares de células B pelo *BepiPred*. Resíduos de aminoácidos são coloridos em amarelo no gráfico quando atingem escores acima do limiar (*threshold*; 0,35), o eixo X corresponde às posições dos resíduos na sequência (*position*) e eixo Y *score*. (B.2) Estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa, da estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*), onde epítópos de célula B preditos são mostrados em amarelo e epítópos não preditos em verde. (B.3) Sequência da proteína identificada com os determinantes antigênicos (amarelo) preditos para células B.

73

**Figura 14.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose (A) Gel 2D, em SDS- PAGE 12%, corado por Coomassie coloidal. Aproximadamente 70 µg de proteína foram utilizadas para reidratar a tira de IPG

75

(Gradiente de pH imobilizado) de 7 cm, não-linear, pH 3–10. Dois *spots* foram excisados e enviados para análise por MS. **(B, C e D)** Estrutura terciária das proteínas (*UCSF Chimera*): região em amarelo corresponde aos epítopos lineares de células B preditos (*BepiPred*) e regiões em verde aos epítopos não preditos. PM - padrão de peso molecular (kDa).

**Figura 15.** Voltametria de pulso diferencial (DPV) obtidos em eletrodos tipo *screen-printed* de grafite (C110) imobilizado com a fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica na presença de *pool* de amostras de líquor de: **(G1)** pacientes com neurocisticercose (10 amostras) e **(G2)** pacientes com outras desordens neurológicas (10 amostras). 4-DMAA usado como indicador eletroquímico na presença de **(A)** compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $ZnO:Ag_2O$ ) 9% e **(B)** compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $ZnO:Ag_2O$ ) 0,9%.

## RESUMO

Neurocisticercose (NC) é uma infecção parasitária, causada pela forma metacestódea de *Taenia solium* que acomete o sistema nervoso central. Devido à gravidade do quadro clínico da NC há a necessidade de aperfeiçoar o diagnóstico por meio da busca de fontes antigênicas novas e alternativas. Esse estudo teve como objetivo analisar frações antigênicas de metacestódeos de *Taenia saginata*, por proteômica e aplicar estes抗ígenos em plataformas diagnósticas na NC humana. O extrato salino (ES) de metacestódeos de *T. saginata* foi fracionado por cromatografia de gel filtração (resina Sephacryl S-100) e cromatografia de troca iônica em resinas (carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniónica). As frações F1 e F2 (gel filtração) e CMS1, CMS2, DEAES2 e DEAES2 (troca iônica), foram obtidas. O ES e suas frações foram avaliados em eletroforese 1D (F1, F2 e DEAES2) e 2D (DEAES2) para caracterização do perfil proteico e testados por ELISA e/ou *immunoblotting* (1D e/ou 2D) em amostras de soro e/ou líquor de pacientes com NC (G1), com outras infecções parasitárias ou desordens neurológicas (G2) e indivíduos saudáveis (G3) para detecção de anticorpos IgG. Os parâmetros de diagnóstico: sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (AUC) e *likelihood ratios* (LR+ e LR-) foram calculados. A identificação de proteínas de interesse foi realizada por espectrometria de massas (MS) após seleção das frações obtidas por ELISA e/ou *immunoblotting* (1D e/ou 2D). A predição de epítópos de célula B também foi realizada. DEAES2 foi utilizada como sonda para o desenvolvimento de um imunossensor utilizando amostras de líquor. A fração F1 apresentou bandas polipeptídicas de 64-68 kDa. A fração F1 apresentou os melhores parâmetros de diagnóstico, em relação ao ES (Se: 93,3% e 84,4%; Es: 93% e 86%; AUC: 0,990 e 0,928; LR+: 13,42 e 6,07 e LR-: 0,07 e 0,18, respectivamente) no *immunoblotting* quando esta fração foi testada com *pool* de amostras do G1 houve um forte reconhecimento. Duas proteínas foram identificadas: enolase [*Taenia multiceps*] e calreticulina [*T. solium*], e essas proteínas apresentaram 18 e 10 epítópos de célula B preditos, respectivamente. Duas bandas proteicas foram identificadas em F2 (F2a – 20 kDa e F2b – 15 kDa). A análise por MS identificou duas proteínas: mioglobina [*Bos taurus*] (F2a) e glicoproteína de 8 kDa [*T. multiceps*] (F2b), que apresentaram três epítópos preditos. O ELISA utilizando a fração F2 apresentou melhores parâmetros de diagnóstico (Se: 80,0%; Es: 90,5%; AUC: 0,954; LR+: 8,42 e LR-: 0,22), em relação ao ES. DEAES2 (64-68 kDa), apresentou parâmetros de diagnóstico similares ao líquido de vesícula de *T. solium*, em amostras pareadas de soro e líquor. O perfil eletroforético bidimensional revelou 24 spots. Após o *immunoblotting* 2D, utilizando *pool* de líquor de pacientes do G1 e G2, dois spots (1-pl 5,4; > 70 kDa e 2-pl 5,4; > 50kDa) foram selecionados para análise por MS. Três proteínas promissoras para o diagnóstico da NC foram identificadas: *small heat-shock; putative growth regulator 14-3-3* e *calreticulina* [*T. solium*]. O imunossensor immobilizado com DEAES2 apresentou resultados relevantes quando utilizado compósitos de ZnO com Ag<sub>2</sub>O (ZnO:Ag<sub>2</sub>O), 0,9%. Os resultados de voltametria de pulso diferencial (DPV) revelaram picos de intensidade de corrente elétrica: 1,74 µA (G1) e 1,30 µA (G2). Concluiu-se que importantes proteínas das frações antigênicas obtidas por técnicas cromatográficas foram identificadas com potencial aplicação em plataformas imunodiagnósticas na NC humana.

**Palavras-chave:** antígeno heterólogo, cromatografia, espectrometria de massas, imunodiagnóstico, neurocisticercose.

**ABSTRACT: ANTIGENIC FRACTIONS FROM *Taenia saginata* METACESTODES ON HUMAN NEUROCYSTICERCOSIS: PROTEOMIC ANALYSIS AND APPLICATION ON IMMUNODIAGNOSTIC PLATFORMS analysis**

Neurocysticercosis (NC) is a parasitic disease that affects the central nervous system and is caused by *Taenia solium* metacestodes. Due to the seriousness of the clinical picture on NC there is a need to improve diagnosis through the search of new and alternative antigenic sources. This study aimed to analyze antigenic fractions from *Taenia saginata* metacestodes by proteomic tools and apply these antigens in diagnostic platforms to human NC. Saline extract (SE) from *T. saginata* metacestodes was fractionated by: gel filtration (Sephacryl S-100 resin) and ion exchange (carboximethyl-sepharose (CM) – cationic exchanger and diethylaminoethyl-sepharose (DEAE) – anionic exchanger) chromatography. Six antigenic fractions were obtained: F1 and F2 (gel filtration) and CMS1, CMS2, DEAES1 and DEAES2 (ion exchange). SE and its fractions were evaluated by 1D (F1, F2 and DEAES2) and 2D (DEAES2) electrophoresis for proteic profile characterization and tested by ELISA and/or immunoblotting (1D and/or 2D) using serum or cerebrospinal fluid (CSF) from patients with NC (G1), other parasitic diseases or neurologic disorders (G2) and healthy individuals (G3) to detect IgG antibodies. Diagnostic parameters: sensitivity (Se), specificity (Sp), area under curve (AUC) and likelihood ratios (LR+ and LR-) were calculated. Identification of proteins from interest was done by mass spectrometry (MS), after selection of the best fractions by ELISA and/or immunoblotting (1D and/or 2D). The prediction of B cell epitopes was also done. DEAES2 was also used as a probe to develop an immunosensor using CSF samples. F1 presented proteic bands from 64-68 kDa. F1 achieved the best diagnostic parameters when comparing to ES, (Se: 93.3% and 84.4%; Sp: 93% and 86%; AUC: 0.990 and 0.928; LR+: 13.42 and 6.07 and LR: 0.07 and 0.18, respectively), in immunoblotting when testing this fraction with pool of samples from G1 there was strong recognition. Two proteins were identified: enolase [*Taenia multiceps*] and calreticulin [*T. solium*], these proteins presented respectively, 18 and 10 predicted epitopes. Two proteic bands were identified on F2 (F2a – 20 kDa and F2b – 15 kDa). MS analyses identified two proteins: mioglobin [*Bos taurus*] (F2a) and a 8 kDa glicoprotein [*T. multiceps*] (F2b), which presented 3 predicted epitopes. ELISA using F2 presented great diagnostic parameters (Se: 80%; Sp: 90.5%; AUC: 0.954; LR+: 8.42 and LR-: 0.22) if compared with ES. DEAES2 (64-68 kDa), presented diagnostic parameters similar to those achieved when testing vesicular fluid from *T. solium* metacestodes using serum and CSF paired samples. The bidimensional electrophoretical profile revealed 24 spots. After 2D immunoblotting, using pool of CSF samples from patients from G1 and G2 two spots (1-pl 5.4; > 70 kDa and 2-pl 5.4; > 50kDa) were selected for MS analyses. Three promising proteins for NC diagnosis were identified: *small heat-shock; putative growth regulator 14-3-3* and *calreticulin* [*T. solium*]. The immunosensor using DEAE S2 presented relevant results when using ZnO with Ag<sub>2</sub>O (ZnO:Ag<sub>2</sub>), 0,9% composites. Differential pulse voltammetry (DPV) results revealed peaks of electric intensity: 1.74 µA (G1) and 1.30 µA (G2). It can be concluded that important proteins on the antigenic fractions obtained by chromatographic techniques were identified with potential application on immunodiagnostic platforms for human NC.

**Keywords:** heterologous antigen, chromatography, mass spectrometry, immunodiagnosis, neurocysticercosis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos morfológicos de *Taenia* sp.

Os tenídeos pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestodea, Ordem Cyclophyllidea e Família Taeniidae (REY, 2001; HOBERG, 2002). A família Taeniidae é dividida em três gêneros: *Taenia*, *Versteria* e *Echinococcus* (NAKAO et al., 2013; BOBES et al., 2014).

São divididos em escólex, colo e estróbilo e possuem corpos achatados dorso-ventralmente. O estágio adulto, tanto de *Taenia solium* quanto de *Taenia saginata*, apresenta o corpo leitoso, com comprimento médio de 1,5 a 4 metros, para *T. solium*, podendo atingir até 8 metros em *T. saginata*. O escólex de *T. solium* é piriforme, apresentando quatro ventosas e rostro armado com dupla coroa de acúleos. O número de acúleos varia entre 25 a 50 e a coroa está inserida em um rostro entre as ventosas; *T. saginata* não possui rostro armado com acúleos (REY, 2001).

A diferenciação da forma metacestódea entre as duas espécies de *Taenia*, que acometem o homem, é realizada pela observação do escólex: *T. solium* possui rostro armado com acúleos e *T. saginata* não possui rostro. As formas metacestódeas constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, com 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, apresentando no seu interior, líquido vesicular e escólex invaginado. Os tenídeos podem se apresentar sob duas formas: (1) cística com vesícula contendo escólex em seu interior e (2) a racemosa, em forma de cachos, com inúmeras vesículas, mas sem o escólex (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; CORAL-ALMEIDA et al., 2015).

O estróbilo corresponde a parte posterior ao colo do parasito adulto e possui o aspecto de uma fita segmentada, as proglotes, que se desenvolvem a partir do colo. As

proglotes apresentam diferentes estádios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas (SCIUTTO et al., 2000; REY, 2001).

Os ovos de *T. solium* e *T. saginata* são idênticos, sendo impossível diferenciá-los quando examinados ao microscópio de luz (SCIUTTO et al., 2000; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006). São esféricos com aproximadamente 30 a 45 µm de diâmetro, possuem envoltório denominado embrióforo, de tamanho radial revestindo um embrião hexacanto, também denominado de oncosfera.

## **1.2 Ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose**

O ciclo biológico das têniás implica dois hospedeiros, um definitivo e um intermediário. O único hospedeiro definitivo de *T. solium* e *T. saginata* na fase adulta é o homem. Os hospedeiros intermediários de *T. solium* são os humanos e suínos, e de *T. saginata* são os bovinos. Há evidências que na Ásia, a forma metacestódea de *T. solium* foi encontrada em cães, sendo estes também determinados como hospedeiros intermediários (ITO; YANAGIDA; NAKAO, 2016). Existem três fases com relação à população aos e parasitos: adulta no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e formas metacestódeas (fase larval) no hospedeiro intermediário (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

O homem ao ingerir carne crua ou mal cozida de bovinos ou suínos infectados, respectivamente, com formas metacestódeas viáveis de *T. saginata* ou *T. solium* e *Taenia asiatica* desenvolverá a teníase (EOM; RIM, 1993). No tubo digestivo do homem, por ação de proteases e sais biliares, as formas metacestódeas são liberadas das vesículas, por meio de um processo de evaginação, alcançam a parede do intestino delgado e iniciam sua diferenciação em parasito adulto (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; TAKAYANAGUI;

LEITE, 2001; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; FLISSER; VARGAS-PARADA; LACLETTE, 2006; YAMASAKI et al., 2006). As proglotes grávidas são eliminadas entre 60 e 70 dias após a ingestão da carne infectada com os metacestódeos.

A infecção, pela ingestão de ovos viáveis de *T. solium* e *T. saginata* de forma accidental pelo homem, pode ocorrer de várias maneiras: (1) heteroinfecção, que consiste na manipulação direta de água ou alimentos contaminados com fezes humanas, ou manipulação indireta por meio da irrigação e/ou fertilização com água e/ou esterco contaminados; (2) auto-infecção externa, que consiste na ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio indivíduo portador da teníase, geralmente resultado de maus hábitos higiênicos, sobretudo a falta do hábito de lavar as mãos após a defecação; (3) auto-infecção interna, resultante de movimentos antiperistálticos ou de vômitos, que permitem o retorno de algumas proglotes ao estômago, que sofrem a ação do suco digestivo, o que permitirá a eclosão das oncosferas (BARBOSA et al., 2000; REY, 2001; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003, HAWK et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2013). Em casos extremos, além da auto-infecção interna, há relatos de meios alternativos de transmissão dos ovos de *T. solium* como coprofagia nos psicopatas (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

No homem a localização mais importante da forma metacestódea é o sistema nervoso central (SNC), que causa a forma mais grave e frequente da doença que acomete grande número de pessoas, a neurocisticercose (NC). No SNC, o parasito pode alojar-se no parênquima cerebral, espaços subaracnóideo e ventriculares ou na medula espinhal (COSTA-CRUZ et al., 1995; BRUNETTI; WHITE Jr, 2012). Na entanto a fase larval do parasito pode se instalar praticamente em todos os órgãos do corpo humano, incluindo a musculatura esquelética e cardíaca, olhos, tecido subcutâneo, mas raramente na cavidade oral (PUSHKER; BAJAJ; BALASUBRAMANYA, 2005; JAY et al., 2007; IZCI et al., 2008).

### **1.3 Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose**

O complexo teníase-cisticercose é uma importante questão de saúde pública em todo o mundo e demonstra relevante impacto, influenciado por fatores demográficos, culturais e políticos, sendo necessário fortalecer o controle e a vigilância epidemiológica (CARPIO; ROMO, 2016). Sua distribuição engloba países em desenvolvimento, consideradas áreas endêmicas países da Ásia, África e América Latina (MARTINS-MELO et al., 2017).

A urbanização desordenada, a ausência de saneamento básico e a vigilância sanitária deficiente, são os principais fatores que potencializam a disseminação do complexo teníase-cisticercose (KUNGU et al., 2017). Uma vez estabelecido dentro de uma população, o complexo teníase-cisticercose apresenta alta estabilidade epidemiológica, devido a fatores como: a viabilidade dos ovos no ambiente e o potencial de um único parasito infectar vários indivíduos, pelo fato da grande quantidade de ovos liberados (KOBAYASHI et al. 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o complexo teníase-cisticercose atinge cerca de 50.000.000 indivíduos por ano, causando 50.000 mortes anualmente (PAL; CARPIO; SANDER, 2000). O grande problema evidenciado é o fato dos portadores de teníase auto-infectarem-se causando a NC. Apesar de ser uma das doenças parasitárias mais prevalentes do SNC, a NC é considerada uma doença tropical negligenciada pela OMS, desde 2010. Devido à dificuldade de tratamento da NC, busca-se a implantação de medidas de controle. No entanto, para estratégias de controle, indivíduos com NC não são alvos essenciais, pois não carregam o parasito adulto (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003).

Para o controle do complexo teníase-cisticercose, e possivelmente uma eliminação da *T. solium* pode ser empregada uma intervenção por meio dos serviços médico, veterinário e ambiental. O tratamento anti-helmíntico foco-orientado, com quimioterapia

preventiva nos suínos e identificação dos casos de teníase em humanos é uma das medidas de intervenção (PAWLOWSKI, 2008). Além disso, a melhora das condições para criação de suínos e da infra-estrutura sanitária para evitar o acesso dos animais às fezes humanas, e a defecação humana indiscriminada em lugares abertos, também têm mostrados serem úteis no controle destas parasitoses. Manter-se altos padrões da inspeção e processamento de carne e apropriado descarte de carcaças suínas infectadas também auxiliam na prevenção da infecção de suínos e subsequente infecção humana. Em estudo realizado no México durante o período de 1990 a 2009, a NC pode ser considerada não mais um problema de saúde pública, devido à educação sanitária, outro pronto para a prevenção que pode ser combinado a outros, de acordo com o contexto do país (FLISSER; CORREA, 2010). A vacinação de suínos é uma estratégia promissora de prevenção e controle, como exemplo a vacina TSOL18, desenvolvida a partir de proteínas recombinantes de oncosfera de *T. solium* (JAYASHI et al., 2012).

A Força Tarefa Internacional para Erradicação de Doença (FTIED) estabelece quatro possibilidades que indicam o potencial para a erradicação da cisticercose: 1) o ciclo de vida envolve o humano como o único hospedeiro definitivo, 2) os vermes adultos no humano são a única fonte de infecção para os hospedeiros intermediários, 3) a transmissão entre o humano e o suíno pode ser controlada e 4) não existe reservatório silvestre da infecção (FLISSER; RODRÍGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006).

A NC tem sido classificada como uma doença infecciosa emergente em países desenvolvidos, como no sudoeste da Ásia e nos Estados Unidos da América (EUA) (CARPIO, 2002, NDIMUBANZI et al., 2010; RIZVI et al., 2016). Atribui-se essa constatação à imigração de populações originárias de áreas endêmicas, principalmente para o estado da Califórnia, e ao aumento do diagnóstico definitivo com técnicas de neuroimagem (HAWK et al., 2005).

Foram confirmados casos de cisticercose em Los Angeles, sendo a NC a forma mais comum (97,4%), embora tenha-se registrado casos de cisticercose ocular e subcutânea (SORVILHO et al., 2011). Nos EUA e na Europa, 90% dos pacientes diagnosticados com NC são imigrantes latino-americanos (DEL BRUTTO, 2012a; O'KEEFE et al., 2015). Recentemente, estudos apontam estados do sul dos EUA como área endêmica, devido à fronteira com o México, o que torna o fluxo do parasito constante por meio dos imigrantes. Além disso, a disseminação das parasitoses podem ser destacadas em países da América do Norte e Europa devido à migração de latino-americanos (ARRIOLA et al., 2014; COYLE et al., 2012; DEL BRUTTO et al., 2014; GABRIËL et al., 2015; MENDLOVIC et al., 2014; O'KEEFE et al., 2015). Na Europa, de 81 indivíduos avaliados no período 1980-2013, 39 casos (48,1%) foram classificados com NC. O continente de origem era conhecido por 80 indivíduos, a América Latina [n=37 (46,3%)] e a Ásia [n=22; (27,5%)] foram os mais frequentes, seguido da Europa [n=14 (17,5%)] e África [n=7 (8,8%)] (ZAMMARCHI et al., 2016). Devleesschauwer e colaboradores (2017) evidenciam a necessidade de estudos epidemiológicos no continente europeu em relação à endemicidade de *T. solium*.

A NC é endêmica em países em desenvolvimento com alta taxa de imigração para países desenvolvidos (DEL BRUTTO, 2012a). A NC é uma das causas mais comuns de epilepsia, convulsão e problemas neuropsicológicos (PRASAD et al., 2008; CARPIO; HAUSER, 2009; GUINTO; GUINTO, 2013; CARPIO; ROMO, 2015; GONZALES; RIVERA; GARCIA, 2016). Em estudo realizado no sul da Índia, com indivíduos com crise convulsiva, 15,9% apresentaram reatividade em imunoensaios para NC (PRABHAKARAN et al., 2008). Em países em desenvolvimento, a precariedade das condições de saneamento básico e o baixo nível sócio econômico cultural favorecem a disseminação da cisticercose humana (AGAPEJEV, 2003; COYLE et al., 2012). No continente americano a teníase e a cisticercose encontram-se

endêmica na Bolívia, Colômbia, Equador, Guatemala, México, Peru e Brasil (ANTONIUK, 1999; GARCIA et al., 2010). Em um estudo realizado recentemente no Peru, 256 moradores foram submetidos à tomografia computadorizada para pesquisa de NC, destes 48 (18,8%) apresentaram calcificações cerebrais, no entanto a maioria era assintomática (MOYANO et al., 2016).

A NC tem sido apresentada com frequência nos estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, principalmente em indivíduos dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás, sendo o gênero feminino mais acometido (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; BRAGAZZA et al., 2002; AGAPEJEV, 2003; MENDES et al., 2005; BENEDETTI et al., 2007). Devido à falta de diagnóstico específico e de baixo custo, a ocorrência da NC tem sido considerada baixa na região Nordeste (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000; AGAPEJEV, 2003; NASH, GARCIA, 2011; DEL BRUTTO, 2012a). No Brasil os estados de Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, e a cidade Ribeirão Preto (SP) implantaram programas de controle (AGAPEJEV, 2003).

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

#### 1.4 Patogenia, interação parasito-hospedeiro e resposta imune

O pleomorfismo clínico da NC está relacionado com a localização, o número, o tamanho, a fase de desenvolvimento do metacestódeo de *T. solium* e a reação do hospedeiro nos tecidos parasitados (WHITE Jr, 2000; CARDENAS et al., 2012; DEL BRUTTO, 2012b). Diferenças nas manifestações clínicas e no diagnóstico por imagem são observadas na NC entre países de diferentes continentes. Pacientes da Índia apresentam maior frequência de NC sintomática causada por um único e isolado metacestódeo parenquimatoso; em comparação com pacientes da América Latina, que apresentam metacestódeos múltiplos nos ventrículos ou espaço subaracnóideo (BOBES et al., 2014).

A fase larval do parasito passa por vários estádios: vesicular – fase inicial quando cisticercos viáveis têm uma inflamação mínima associada; coloidal – com a perda da habilidade de controle da resposta imune do hospedeiro pelo cisticerco; sua parede é infiltrada e rodeada por células inflamatórias, compostas primariamente por células mononucleares, que também podem entrar no fluido do cisticerco; granular/nodular – ocorre colapso de sua cavidade e fibrose devido ao progresso da resposta imune; calcificado – eventualmente, o parasito é substituído por fibrose progressiva, que pode calcificá-lo (WHITE Jr, 2000).

A forma metacestódea pode persistir no hospedeiro humano por longos períodos, em muitos casos por anos, sem desencadear uma reação inflamatória, permanecendo assintomático. Em contraste, a resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática (CARPIO, 2002; ALARCÓN, 2006). Os sintomas da NC incluem: náusea, vômito, cefaléia, ataxia, sinais neurológicos focais, hidrocefalia, vasculite, infarto cerebral e quadros neuropsiquiátricos diversos (FORLENZA et

al., 1997; SAWHNEY et al., 1998; RAMOS-ZÚÑIGA et al., 2013). É considerada uma doença polimorfa, pois não existe uma sintomatologia própria ou um quadro único que diferencie a cisticercose de outras desordens neurológicas, apresentando os mais diversos quadros clínicos. (TAKAYANAGUI; ODASHIMA, 2006; SOTELO et al., 2011; ZYMBERG, 2013).

A resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática, por meio da proliferação de linfócitos e posterior diferenciação em células efetoras tipo Th1 e Th2, com subsequente produção de várias citocinas, ou de células plasmáticas, com consequente produção de anticorpos específicos. Há elevação dos níveis de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgE, e IgA, em ordem decrescente, respectivamente quanto aos níveis detectáveis. Os maiores valores são detectados em casos de cisticercose intraventricular e em casos de múltiplas manifestações (ODASHIMA; TAKAYANAGUI; FIGUEIREDO, 2002; CARPIO, 2002; SCIUTTO et al., 2007). O equilíbrio parasito – hospedeiro é mantido como resultado da habilidade do parasito sobreviver no hospedeiro cronicamente (VERMA et al., 2011).

Na resposta humoral destacam-se os anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*, que são detectados, tanto em amostras de soro, quanto em amostras de líquor, além de serem encontrados em níveis superiores às demais classes de imunoglobulinas em diferentes amostras biológicas (SHORT et al., 1990; BUENO et al., 2000a; PARDINI et al., 2002). O tratamento da NC deve levar em conta múltiplos fatores, incluindo sintomas, localização, número, estágio e tamanho dos cistos, sendo que as opções terapêuticas incluem medicamentos, cirurgia ou monitoramento (KRAFT, 2007).

### 1.5 Diagnóstico da neurocisticercose humana

Antes do século XX, o diagnóstico da NC era limitado, uma vez que se baseava em manifestações clínicas visíveis externamente a olho nu, como presença de nódulos subcutâneos ou exames de autópsia (GARCIA et al., 2002). Atualmente, o diagnóstico da NC baseia-se principalmente na neuroimagem, que nem sempre é acessível em áreas atingidas (GUINTO, GUINTO, 2013). Assim, critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais, parasitológicos e neuroimagem estabelecem o diagnóstico da doença (NASH, GARCIA, 2011; DEL BRUTTO et al., 2017). O diagnóstico laboratorial compreende a pesquisa direta da forma metacestódea de *T. solium*, por meio de exames anatômopatológicos após intervenção cirúrgica, biópsia ou necropsia.

Para realização do diagnóstico parasitológico recomenda-se o uso de três amostras fecais colhidas em dias alternados, para alcançar 100% de sensibilidade. A dificuldade do exame com várias amostras fecais reside no tempo necessário para coleta, inconveniência para o paciente e resistência do médico em solicitá-lo (DECKERS; DORNY, 2010). Embora a detecção de ovos em fezes não determine a ocorrência de NC, o exame parasitológico é importante para diagnosticar portadores de teníase e assim impedir a propagação do ciclo (GILMAN et al., 2012). Métodos moleculares aplicados à amostras de fezes, como a PCR podem melhorar as taxas de detecção, no entanto é impraticável em países endêmicos pelo custo econômico (MAHANTY; GARCIA, 2010).

A neuroimagem compreende a tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RM) que podem evidenciar o número e tamanho das lesões, a regressão da infecção e o nível da reação inflamatória do hospedeiro contra o parasito (PRETELL et al., 2005; GARG et al., 2008). A RM é mais sensível na demonstração de metacestódeos

intraventriculares e subaracnoideos e na identificação do escólex, ao passo que a TC é melhor em mostrar as calcificações (ALARCÓN, 2006; SINGHI; SUTHAR, 2015).

O imunodiagnóstico complementa o diagnóstico da NC, auxiliando a neuroimagem, principalmente nos casos em que os métodos diagnósticos de neuroimagens não são acessíveis (PRABHAKARAN et al., 2004). A detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* e de抗ígenos circulantes do parasito em amostras de soro e líquor são utilizados para o imunodiagnóstico da NC, no entanto mais estudos que identifiquem proteínas específicas são necessários, para contribuir com o controle da NC humana (COSTA et al., 1982; COSTA, 1986; SCIUTTO et al., 2000; DECKERS; DORNY, 2010; MICHELET et al., 2011; GRIPPER, WELBURN, 2017).

A presença de anticorpos no soro não informa a localização da forma larval do parasito (FOGANG et al., 2015). Assim os resultados dos testes imunológicos devem ser interpretados levando-se em consideração as manifestações clínicas. Em um estudo comparativo Sako e colaboradores (2015) não observaram diferenças na sensibilidade e especificidade na detecção de anticorpos anti-*Taenia* entre amostras de soro e líquor.

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

*Immunoblotting* e o teste ELISA apresentam diferenças quanto à sensibilidade e especificidade, assim a importância dos dois testes é bem documentada na literatura.

A utilização de anticorpos monoclonais possibilita o diagnóstico mais preciso e confiável, o anticorpo monoclonal HP10 foi utilizado para o diagnóstico da NC em amostras de líquor: um grupo amostral de 34 pacientes foram diagnósticos com NC ativa extraparenquimatosa e outro grupo com 26 indivíduos tratados e curados para NC foram classificados como negativos. (FLEURY et al., 2016).

### **1.5.1 Antígenos heterólogos**

O estudo de antígenos alternativos para o imunodiagnóstico da NC faz-se necessário para o conhecimento de casos isolados da doença em países não endêmicos e em regiões onde a coleta de metacestódeos de *T. solium* é difícil (FLEURY et al., 2003; DEL BRUTTO, 2014; CORAL-ALMEIDA et al., 2015).

Antígenos alternativos como metacestódeos de *Taenia crassiceps* são utilizados, com resultados promissores no diagnóstico da NC, sendo obtidos por infecção natural em camundongos da linhagem BALB/c. Diferentes extratos antigênicos da forma metacestódea do parasita foram analisados, como membrana e líquido de vesícula, em comparação com o antígeno homólogo de *T. solium*. As bandas de baixo peso molecular (14 e 18 kDa) foram identificadas com potencial aplicação no diagnóstico (PARDINI et al., 2002). Os principais marcadores antigênicos da forma metacestódea de *T. crassiceps* apresentam peso molecular de 13-19 kDa (ROSSI et al., 2000) e peptídeos de glicoproteínas de 14 kDa (GP14) apresentam alinhamento parcial com a proteína homóloga de metacestódeos de *T. solium* (PERALTA et al., 2010).

Bueno e colaboradores (2000b) compararam a reatividade do antígeno heterólogo de *T. crassiceps* (Tcra) e do antígeno homólogo de *T. solium* (Tso) pelo teste ELISA em amostras de soro e líquor. A especificidade foi equivalente para ambos os antígenos 80% e 100%, para soro e líquor, respectivamente. Tso e Tcra apresentaram, respectivamente, 94,1 e 95,6% de sensibilidade em amostras de líquor e 70,6% e 91,2% de sensibilidade em amostras de soro.

Os metacestódeos de *T. saginata* foram avaliados como antígeno alternativo no diagnóstico sorológico da NC humana; a principal vantagem do uso desse antígeno é sua obtenção, que não necessita a manutenção em cobaias e pode ser obtido de carne bovina infectada destinada ao descarte em frigoríficos. Não foi observada diferença estatisticamente significante entre os antígenos de metacestódeos de *T. saginata* e *T. solium*, demonstrando que o metacestódeo de *T. saginata* pode ser utilizado como antígeno alternativo no diagnóstico da NC humana (OLIVEIRA et al., 2007, 2009). Foram utilizados os testes de imunofluorescência indireta, ELISA e *immunoblotting* que apresentaram sensibilidade de 85%, 95% e 95% e 75%, 80% e 85% utilizando como antígeno, respectivamente, metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata*. A especificidade dos três testes utilizando antígeno de metacestódeos de *T. solium* e de *T. saginata* foi de 95%, 89% e 94% e 96%, 89% e 94%, respectivamente. Bandas com peso molecular de 64-68 kDa apresentaram maior reatividade ao *immunoblotting* em amostras de soro (OLIVEIRA et al., 2007).

### **1.5.2 Antígenos fracionados**

Para diminuir a reatividade cruzada com outros parasitos, a utilização de extratos antigênicos fracionados, por técnicas cromatográficas, consistem em uma ferramenta

importante para o diagnóstico da NC no desenvolvimento de testes sensíveis e específicos; a possibilidade de substituição do uso dos extratos antigênicos totais, que são misturas heterogêneas de proteínas, glicoproteínas e outros componentes. As principais vantagens dessas técnicas incluem produção rápida, fácil, de baixo custo e com alta eficiência (NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Outras técnicas de fracionamento foram utilizadas para selecionar antígenos específicos e sensíveis para o diagnóstico da NC. Com o uso do Triton X-114 (TX-114), as frações detergente obtida a partir de metacestódeos de *T. solium* e *T. saginata*, foram selecionadas, apresentando alta sensibilidade e especificidade nos testes ELISA e *immunoblotting* (MACHADO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2010). No entanto utilizando o mesmo fracionamento Silva e colaboradores (2017) obtiveram as frações detergente e aquosa, a partir de metacestódeos de *T. crassiceps*, com potencial aplicabilidade no teste ELISA em amostras de líquor.

Com a técnica de cromatografia de afinidade em resina de concanavalina A e jacalina, as frações não ligantes, do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* se mostraram mais específicas e sensíveis no diagnóstico da NC humana (NUNES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010). Componentes inespecíficos para o diagnóstico da NC possuem afinidade com concanavalina A e jacalina, deste modo as frações não ligantes de metacestódeos de *T. solium* perderam alguns componentes que intensificavam as reações (MACHADO et al., 2013).

A cromatografia de troca iônica se baseia na separação de proteínas pela carga molecular, isto é proteínas são retidas nas resinas devido às interações eletrostáticas. Essa técnica utiliza, comumente, as resinas: carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniônica. Nunes e colaboradores (2013)

obtiveram a fração DEAES2 de metacestódeos de *T. saginata*; e esta fração apresentou alto desempenho diagnóstico nos testes ELISA: 93,4% de sensibilidade e 92,6% de especificidade em amostras de soro. O *immunoblotting* revelou marcadores antigênicos de NC ativa com peso molecular de 64-68 kDa. Ribeiro e colaboradores (2014) utilizaram a cromatografia de troca iônica/aniônica para fracionar o extrato antigênico obtido de metacestódeos de *T. solium*; e a fração DEAES2 apresentou 90% de sensibilidade e 90,4% de especificidade em amostras de soro. Amostras de soro de pacientes com NC foram reagentes com as bandas de 20-25, 43-45, 55-50, 60-66, 82, 89 e 140 kDa.

O complexo de proteínas de 120 kDa do líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium* foi fracionado e identificado por cromatografia e espectrometria de massa *in tandem*. Verificou-se que o complexo de proteínas consistia em dois componentes principais de 42-46 kDa e 22-28 kDa. A partir desses componentes, 42-46 kDa continha 3 subunidades adicionais de 22, 28 e 38 kDa e os marcadores 22-28 kDa, 3 subunidades de 14, 16 e 18 kDa. Essas subunidades foram identificadas como glicoproteínas de baixo peso molecular (LEE et al., 2005).

Os avanços no diagnóstico sorológico da NC consistem na identificação e síntese de抗ígenos para se obter ensaios com alto desempenho, de fácil reprodutibilidade e que não dependam do suprimento contínuo de parasito para preparo antigênico (GARCIA et al., 2005). Peptídeos expressos em fagos apresentaram alto potencial de aplicabilidade no diagnóstico da NC: sensibilidade e especificidade de 100%, respectivamente para NC<sub>4</sub><sup>1</sup> e NC<sub>2</sub><sup>8</sup> e ausência de reatividade cruzada com amostras de pacientes infectados com *Echinococcus granulosus* (RIBEIRO et al., 2010). As frações antigênicas obtidas por técnicas cromatográficas, poderão ser utilizadas como alvos na seleção de peptídeos expressos em fagos específicos para o diagnóstico da NC.

Os antígenos empregados para a detecção de anticorpos específicos aprimoram-se do extrato antigênico bruto para frações antigênicas fracionadas, resultando no aumento da sensibilidade e da especificidade do teste. Dentre as frações obtidas por técnicas cromatográficas e selecionadas por testes imunológicos, como ELISA e *immunoblotting*, seguido da caracterização por eletroforese unidimensional (1D) e bidimensional (2D). A purificação extrema tem o caminho de determinar uma região de interesse, mas pode levar a perda da complexidade e, finalmente, a identificação de proteínas de interesse por espectrometria de massa e posterior síntese de peptídeos relevantes para o diagnóstico da NC.

### **1.5.3 Imunossensores**

Biosensores são dispositivos de detecção biológicos e são classificados de acordo com o analito (enzimas, ácidos nucleicos, peptídeos, células, tecidos animais ou vegetais). Quando são utilizados na detecção da interação antígeno-anticorpo são chamados de imunossensores (HOCK, 1997; LIU; LIN, 2007). Possuem tamanho reduzido, elevada sensibilidade e podem ser reutilizáveis, possibilitando a análise rápida com pequeno volume de amostra (TYMECKI; KONCKI, 2006).

A quantificação dos sinais de interação se baseia na conexão do imunossensor a um transdutor, onde o sinal biológico é transformado em sinal elétrico. Tal plataforma destaca-se por sua importância analítica em diagnósticos clínicos, controle de doenças, detecção de fármacos, controle de qualidade de água e alimentos (BALVEDI et al., 2014).

O 4-dimetilamino-2,3-dimetil-1-fenil- $\Delta^3$ -pirazolin-5-ona (4-DMAA) é um composto farmacêutico ativo e utilizado como analgésico, antipirético e anti-inflamatório (DESHMUKH

et al., 2015). Com o intuito de aumentar a condutividade elétrica nos imunossensores o 4-DMAA pode ser utilizado no reconhecimento entre proteínas.

Nanopartículas inseridas aos imunossensores possibilitam condições ideais para detecção de DMAA a partir do reconhecimento entre antígeno e anticorpo, além de mantêm sua atividade biológica. Elas ampliam a transferência de elétrons entre as biomoléculas e a superfície dos eletrodos, melhorando a conformação e maior atividade biológica, resultando em um melhor desempenho sensorial (PRAKASH et al., 2013; GRABOWSKA et al., 2014).

As propriedades físico-químicas influenciam os níveis dos sinais eletroquímicos necessários para o desenvolvimento de imunossensores para a detecção de materiais biológicos, assim as nanopartículas são utilizadas com a finalidade de melhorar o sinal de detecção (DING et al., 2013), que as tornam interessantes para a incorporação. Além das características citadas possuem biocompatibilidade, condutividade, atividade catalítica ou estabilidade que podem influenciar no aumento da área de superfície e favorecer a transferência eletrônica, amplificando sinais eletroquímicos (REVERTÉ et al., 2016).

Algumas das nanopartículas utilizadas são as magnéticas (ROCHA-SANTOS, 2014), de dióxido de titânio (GARCÍA-VALVERDE et al., 2014), de ouro (LI; SCHLUESNER; XU., 2010), de óxido de zinco (WANG et al., 2012), de sulfeto de cádmio (OSIPYONOK et al., 2008) e de óxido de zinco dopadas com ferro (GUPTA; GUPTA, 2005). O uso de nanopartículas em compósitos de óxido de zinco com óxido de prata é utilizado em imunossensores, porém somente no diagnóstico de doenças causadas por bactérias (SHARMA et al., 2013).

O interesse no desenvolvimento de imunossensores decorre da necessidade de uma análise rápida, aplicada na rotina laboratorial e apropriada a um grande número de amostras. O teste possibilita a utilização de pequeno volume de amostra, pode ser

reutilizado e/ou regenerado e possui melhor desempenho em relação aos testes imunológicos, como a ELISA e o *immunoblotting*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Fracionar componentes antigênicos de metacestódeos de *T. saginata*, aplicá-los em plataformas diagnósticas na neurocisticercose humana e identificar proteínas de interesse.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produzir extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*;
- Isolar componentes antigênicos de metacestódeos de *T. saginata* por cromatografia de gel filtração e de troca iônica;
- Analisar o perfil eletroforético do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e de suas frações antigênicas obtidas em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) unidimensional (1D) e/ou bidimensional (2D) por cromatografia de gel filtração e/ou de troca iônica;
- Detectar anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro e/ou líquor frente aos extratos antigênicos por ELISA;

- Comparar a reatividade na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao extrato salino de metacestódeos de *T. saginata*, suas frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica e o líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium* por ELISA em amostras pareadas de soro e líquor;
- Realizar *immunoblotting* 1D e/ou 2D em amostras de soro e/ou líquor frente aos extratos antigênicos obtidos para detecção de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*;
- Identificação de proteínas de interesse, das frações obtidas por cromatografia de gel filtração e de troca iônica, por espectrometria de massa;
- Padronizar um imunossensor usando, como sonda a fração antigênica DEAES2, obtida por cromatografia de troca iônica em amostras de líquor.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz, e no Laboratório de Imunoquímica e Imunotecnologia, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior. As amostras de soro e líquor estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. A manutenção destes espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) sob o protocolo nº 041/2008. As formas metacestódeos de *T. saginata* estavam disponíveis no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses. O presente projeto foi aprovado no CEP/UFU sob o protocolo nº 382/2011.

Parte do estudo vinculado ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE)/CAPES foi realizado no Instituto de Investigação Biomédica da Universidade Nacional Autónoma do México (UNAM), sob responsabilidade da Profa. Dra. Edda Lydia Sciutto Conde e do Prof. Dr. Raúl José Bobes Ruiz. As amostras de soro e líquor estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UNAM sob o protocolo de nº 63/14.

#### **3.2 Caracterização dos grupos de estudo**

Foram avaliadas amostras de três grupos de soro e/ou líquor. Para cada extrato antigênico, um painel de amostras de soro e/ou líquor foi utilizado.

**Grupo 1 (G1)** - amostras de soro e/ou líquor: pacientes com diagnóstico definitivo para NC: (a) todos os pacientes apresentavam pelo menos um tipo de manifestação clínica sugestiva de NC, sem sinais de cisticercose em outros órgãos; (b) todos os pacientes eram provenientes de área onde a cisticercose é endêmica; (c) todas as amostras de soro e/ou líquor foram positivas no teste ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- metacestódeos de *T. solium*, utilizando extrato salino de metacestódeos de *T. solium*; (d) todos pacientes apresentam evidência do parasito, comprovado através de neuroimagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância magnética), classificados de acordo com Sotelo e colaboradores (1985) em NC ativa (metacestódeos viáveis ou em degeneração) e NC inativa (metacestódeos calcificados). Critérios de acordo com Del Brutto (2012b).

**Grupo 2 (G2)** - amostras de soro e/ou líquor: pacientes com outras infecções parasitárias [Todas as amostras de soro foram provenientes de indivíduos submetidos a exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras de cada indivíduo, pelo método de Ritchie (1948)] e pacientes com outras desordens neurológicas, respectivamente.

**Grupo 3 (G3)** - amostras de soro de indivíduos saudáveis: negativos para parasitos intestinais em exames parasitológicos de fezes, realizados com três amostras, pelos métodos de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e de Lutz (1919).

### 3.2.1 Amostras de soro: cromatografia de gel filtração

#### 3.2.1.1 Fração antigênica F1

**G1:** 45 amostras de soro, sendo 24 de pacientes com NC ativa e 21 de pacientes com NC inativa.

**G2:** 65 amostras de soro [*Ascaris lumbricoides* (n=5), *Entamoeba histolytica/dispar* (n=2), *Enterobius vermicularis* (n=6), *E. granulosus* (n=8), *Giardia lamblia* (n=8), ancilostomatídeos (n=7), *Hymenolepis nana* (n=4), *Schistosoma mansoni* (n=4), *Strongyloides stercoralis* (n=8), *Taenia* sp. (n=5) e *Trichuris trichiura* (n=4). Coinfecção: ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (n=1), ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* (n= 1), *Entamoeba histolytica/dispar* + *G. lamblia* (n=1) e *H. nana* + *E. vermicularis* (n=1)].

**G3:** 50 amostras de soro controle.

#### 3.2.1.2 Fração antigênica F2

**G1:** 50 amostras de soro, sendo 25 de pacientes com NC ativa e 25 de pacientes com NC inativa.

**G2:** 55 amostras de soro [*A. lumbricoides* (n=6), *E. histolytica/dispar* (n=2), *E. vermicularis* (n=6), *G. lamblia* (n=6), ancilostomatídeos (n=8), *H. nana* (n=4), *S. mansoni* (n=4), *S. stercoralis* (n=9) *Taenia* sp. (n=3) e *T. trichiura* (n=4). Coinfecção: ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* (n=1), ancilostomatídeo + *A. lumbricoides* (n= 1), *E. histolytica/dispar* + *G. lamblia* (n=1)].

**G3:** 50 amostras de soro controle.

### **3.2.2 Amostras de soro e líquor: cromatografia de troca iônica**

Um painel de amostras pareadas de soro e líquor, de pacientes do México foi utilizado, para comparar a reatividade entre as frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica a partir do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e o líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium*.

**G1:** 68 amostras pareadas de soro e líquor, sendo 39 pacientes com NC ativa (4 com localização parenquimatoso e 35 extraparenquimatoso) e 29 pacientes com NC inativa (24 com localização parenquimatoso e 5 extraparenquimatoso).

**G2:** 30 amostras pareadas de soro e líquor [ataxia cerebelar (n=1), cefaleia (n=1), cisto subaracnoíde (n=1), doença desmielinizante (n=14), fístula liquórica (n=5), hidrocefalia (n=1), higroma subdural (n=1), hipertensão intracraniana crônica (n=1), papiledema (n=2), síndrome cerebral orgânica (n=1), trombose venosa cerebral (n=1), vertigem e zumbido em estudo (n=1)].

### **3.2.3 Amostras de líquor: Imunossensor**

**G1:** 10 amostras de líquor, sendo 5 de pacientes com NC ativa e 5 de pacientes com NC inativa.

**G2:** 10 amostras de líquor: cefaleia (n=4), cefaleia e meningite (n=1), cefaleia e neuropsicopatia (n=1), crise convulsiva (n=3), hidrocefalia (n=1).

### **3.3 Obtenção das formas metacestódeas de *T. saginata* e do líquido de vesícula de *T. solium***

Os metacestódeos de *T. saginata* e de *T. solium* provenientes da musculatura esquelética de bovinos de suínos, respectivamente, ambos naturalmente infectados, foram separados por dissecação e lavados em solução salina (NaCl 0,15M) por quatro vezes, identificados e armazenados a -20 °C. Também foram retirados metacestódeos do parênquima cerebral de suínos.

### **3.4 Preparação do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e do líquido de vesícula de *T. solium***

Para produção do extrato salino (ES) de *T. saginata*, 50 metacestódeos foram utilizados, de acordo com Nunes e colaboradores (2016). Os metacestódeos foram ressuspensos em 5 mL de tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,4) contendo inibidores de proteases: 100 µL/mL de extrato de cOmplete ULTRA (Tablets, Mini, EASYPac, Roche, Alemanha), preparado conforme instruções do fabricante (1 pastilha para cada 10 mL de água ultrapura). Em seguida, a mistura foi submetida à cinco ciclos de congelamento, maceração e descongelamento em banhos de nitrogênio líquido, até não se observar metacestódeos integrais. Em seguida, a mistura foi incubada a 4 °C por duas horas sob agitação lenta e posteriormente centrifugada a 12400 x g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante obtido constituiu o ES. O extrato antigênico do líquido de vesícula (LV) de metacestódeos de *T. solium* foi produzido de acordo com Larralde e colaboradores (1986). O LV foi obtido por rompimento dos metacestódeos íntegros, antes do congelamento dos músculos dos suínos.

O cálcio foi removido pela adição de 50 µL de oxalato de amônio (0,3 M) e 25 µL de amônia (1:3 v/v diluído em H<sub>2</sub>O destilada) para cada 1 mL de LV. Posteriormente, o LV foi centrifugado (2000 x g por 4 min, a 20 °C), o precipitado foi descartado e o sobrenadante estocado em alíquotas de 100 µL e armazenado em nitrogênio líquido. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford (1976) ou Lowry e colaboradores (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina.

### **3.5 Cromatografias do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata***

#### **3.5.1 Cromatografia de gel filtração**

O fracionamento do ES de metacestódeos de *T. saginata* foi realizado por cromatografia de gel filtração, de acordo com Nunes e colaboradores (2016). A suspensão da resina para cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA) foi preparada em volume final de 80 mL na coluna (vidro, tamanho 1,5 x 50 cm, volume máximo 89 mL, área da secção transversal 1,77 cm<sup>2</sup>, Bio-Rad Laboratories, EUA), suficiente para aplicação do ES (5 % do leito cromatográfico). A resina foi empacotada com água ultrapura à temperatura ambiente (TA). Com uma pipeta, a resina foi adicionada em movimentos circulares pela parede da coluna, até formação de decantado homogêneo. Após o empacotamento, foi armazenada a 4 °C.

A resina foi equilibrada em PBS com pelo menos 5 vezes o volume da coluna. O ES (4 mL, concentração mínima de 6000 µg/mL), após centrifugação e acréscimo de inibidores de proteases cOmplete ULTRA (Tablets, Mini, EASYPac, Roche, Alemanha), foi aplicado à coluna com auxílio de seringa (50 mL) e bombeado até o influxo total. Em seguida, foram

adicionados e bombeados 4 mL de PBS (4 °C) para evitar a formação de câmaras de mistura.

As frações foram coletadas automaticamente (modelo 2110, Bio-Rad, EUA) em alíquotas de, aproximadamente, 1 mL. O volume final coletado correspondeu ao dobro do volume da resina (160 mL).

As alíquotas foram monitoradas quanto à presença de conteúdo proteico pelo método de Bradford (1976) e lidas em espectrofotômetro de microplacas a 595 nm (Epoch, BioTek Instruments, EUA). O cromatograma foi gerado, e os tubos compreendidos no pico de absorbância foram analisados por eletroforese unidimensional, que permitiu a definição de duas frações (F1 e F2). Após o uso, a resina foi lavada com PBS e armazenada (4 °C) em PBS acrescido de azida sódica (0,1 %).

### **3.5.2 Cromatografia de troca iônica**

O fracionamento do ES de metacestódeos de *T. saginata* foi realizado por cromatografia de troca iônica, de acordo com Nunes e colaboradores (2013). Foram utilizadas as seguintes resinas: carboximetil-sepharose (CM) - trocadora catiônica e dietilaminoetil-sepharose (DEAE) - trocadora aniônica (GE Healthsciences, EUA). O fracionamento foi realizado em microtubos. As resinas CM e DEAE foram equilibradas com 500 µL em PBS, foi aplicado 200 µL do ES de metacestódeos de *T. saginata*, submetido à agitação horizontal por 20 min a 4 °C. Os sobrenadantes constituíram a 1<sup>a</sup> fração (CMS1 e DEAES1). Em seguida, as resinas foram lavadas 3 vezes com 500 µL PBS e foram eluídas com o mesmo volume de PBS acrescido de cloreto de sódio (NaCl) 0,5M. Posteriormente, foram submetidas à agitação horizontal por 20 min a 4 °C e centrifugadas por 2 min em 2000 rpm. Os sobrenadantes constituíram a 2<sup>a</sup> fração (CMS2 e DEAES2). A seguir, as resinas foram recuperadas com 3-5

ciclos de lavagem em tampão básico (carbonato-bicarbonato, pH 9,6 – diluído 10 vezes em água destilada), seguido de tampão ácido (acetato de sódio, pH 4,5). As resinas foram estocadas em etanol 20% e armazenadas a 4 °C. Foi realizada a dosagem proteica das frações resultantes pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

### **3.6 Análise do perfil eletroforético dos extratos antigênicos em géis de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) unidimensional (1D) e bidimensional (2D)**

#### **3.6.1 Eletroforese unidimensional (1D)**

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) gel gradiente 4-12%, 12%, 15% ou 17% foram realizadas para analisar o perfil proteico do ES de metacestódeos de *T. saginata* e das frações antigênicas obtidas pelas técnicas cromatográficas. As amostras e o padrão de peso molecular (RECOM *BLUE Wide Range Protein Marker*, Real Biotech, Taiwan) e (BioRad, EUA) foram submetidos à SDS-PAGE, em condições desnaturantes, não redutoras, de acordo com Laemmli (1970).

O gel foi preparado em suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical (Hoefer S300, EUA). Antes da aplicação no gel, o extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* e as frações foram diluídos em tampão de amostra (Tris-HCl 100 mM (pH 6,8) + SDS 4% + azul de bromofenol 0,2% + glicerol 20%) 10x, e submetidos a aquecimento por três min em banho-maria. As placas foram acopladas nas cubas contendo tampão de corrida Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 5,5 mM SDS). A migração dos polipeptídeos foi realizada em corrente de 20 mA por aproximadamente uma hora. Padrão de peso molecular

foi utilizado para o cálculo dos pesos moleculares relativos das bandas proteicas presentes nas amostras.

A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata pelo método de Friedman (1982), com modificações, ou por azul de Coomassie G-250 (Coomassie *Brilliant Blue* G-250 70 mg + 2 mL de ácido clorídrico), pelo método de Dong e colaboradores (2011). O gel foi digitalizado em *scanner* para documentação. As bandas do perfil de cada amostra foram comparados ao padrão de massa molecular referência em kiloDalton (kDa), para estimar as massas moleculares relativas das amostras. A análise foi realizada utilizando método gráfico pelo programa Image J (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA).

### **3.6.2 Eletroforese bidimensional (2D)**

Para a eletroforese 2D, foi utilizada a fração DEAES2, que apresentou melhores parâmetros de diagnóstico, obtida por cromatografia de troca iônica. Todos os procedimentos foram realizados utilizando o sistema *Protean IEF Cell* (Bio-Rad, EUA) e os reagentes empregados de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, foi realizada a limpeza da amostra utilizando o kit *2D-Clean up* (BioRad, EUA), em seguida a concentração proteica foi determinada com o kit *2D-Quant* (Amersham-GE Healthcare, Reino Unido).

Para focalização isoelétrica (IEF) foram utilizadas tiras de 7 cm com gradiente de pH imobilizado - IPG strips, pH 3-10 (BioRad, CA-EUA). Depois da quantificação proteica, a fração antigênica DEAES2 contendo de 50 a 70 µg de proteína foi diluída em tampão de reidratação (ureia 7 M; tioureia 2 M; CHAPS 4 %; 3,5 µL de ditiotreitol [DTT] 0,86 M; 3 µL de anfólitos 0,2 % e azul de bromofenol) para um volume final de 125 µL por amostra. Após absorção da

solução, as tiras foram recobertas com óleo mineral não condutível e, em seguida, submetidas à reidratação passiva por 12 horas a 20 °C. A fração DEAES2 foi submetida à focalização a 20 °C e 50 µA por tira. Os seguintes parâmetros foram aplicados: (I) incremento rápido de voltagem de 250 V por uma hora, (II) incremento rápido de voltagem de 500 V por uma hora, (III) voltagem linear de 4000 V por duas horas e (IV) voltagem máxima até 10000 V/hora.

Ao término da focalização as tiras foram equilibradas em solução tampão de equilíbrio (ureia 6 M; 0,05 M Tris-HCl pH 8,8; SDS 2% e glicerol 30%) em duas etapas: (I) 2,5 mL de tampão de equilíbrio com DTT 1% por 15 min; (II) 2,5 mL de tampão de equilíbrio com iodoacetamida 2,5%, por igual período. A seguir, as tiras foram lavadas (20x) em solução tampão Tris-glicina-SDS e aplicadas na superfície do gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 12%), sendo seladas com solução de agarose 0,5%, contendo azul de bromofenol. O padrão de peso molecular (BioRad, EUA) foi aplicado em papel de filtro. A eletroforese foi realizada aplicando-se corrente constante de 200 V até completar o procedimento no sistema *Mini Protean cell* (Bio-Rad EUA). Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com Navarrete-Perea e colaboradores (2014) e com *Comassie Brilliant Blue G-250* coloidal, para envio para espectrometria de massas. As imagens dos géis 2D foram analisadas no programa computacional *PDQuest* (Bio-Rad, EUA) para determinar as massas moleculares aparentes e os pontos isoelétricos dos polipeptídeos do extrato antigênico. As análises foram realizadas em triplicatas.

### 3.7 Testes sorológicos

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

Os testes ELISA foram realizados de acordo com Nunes e colaboradores (2013; 2016), com modificações. Ensaios preliminares foram realizados para determinar condições ótimas para a reação ELISA por meio das diluições dos antígenos, do conjugado e das amostras de soro e líquor.

##### 3.7.1.1 ES e fração antigênica F1 e F2

Como suporte para a adsorção do ES de metacestódeos de *T. saginata* e da fração antigênica F1 e F2 em concentração de 10 µg/mL e 10 µg/mL/poço, respectivamente, a um volume final de 50 µL/poço em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Interlab, Brasil) foram utilizadas e incubadas por 18 horas a 4 °C. Em seguida as placas foram lavadas uma vez, de cinco min, com PBS acrescido de Tween 20 a 0,05% (PBS-T). As amostras de soro, testadas na diluição 1/200 em PBS-T acrescido de 3% de leite desnatado (PBS-TM), foram acondicionadas (50 µL/poço) e incubadas por 45 min a 37 °C. Após lavagens com PBS-T, por três ciclos de cinco min, foi adicionado o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma Chemical, EUA) na diluição 1/2000 em PBS-T (50 µL/poço). A reação foi incubada por 45 min a 37 °C. Após três lavagens, a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD), preparado no momento de uso (0,005g de OPD + 12,5mL de tampão citrato fosfato 0,1 M pH 5,0 + 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%).

Após 15 min, à TA e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 $\mu$ L de solução 2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor ELISA (TP Reader, Thermo Plate, Brasil).

### **3.7.1.2 ES, LV e frações antigênicas CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2**

Para adsorção dos抗ígenos (ES, LV, CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2) foram utilizadas placas de baixa afinidade (Nunc, Maxisorp, Thermo Fisher Scientific, catálogo 80040LE0910, EUA) sensibilizadas em concentração de 5  $\mu$ g/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, incubadas *overnight* a 4 °C. Três ciclos de lavagem foram feitos em lavadora de microplacas (Thermo Fisher Scientific, EUA) com PBS-T. Foram testadas amostras de soro na diluição 1/200 em PBS-TM 3% e amostras de líquor na diluição 1/10 em PBS-T; e, depois, incubadas por 45 min a 37 °C. Após seis ciclos de lavagens, foi adicionado o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Invitrogen, Life Technologies, EUA) na diluição 1/10000 (50  $\mu$ L/poço) em PBS-T. A reação foi incubada por 45 min a 37 °C. Após o mesmo ciclo de lavagens, 100  $\mu$ L de substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Invitrogen, Life Technologies, EUA) foram adicionados a cada poço. A reação foi interrompida após 10 min de incubação em gelo, pela adição de 50  $\mu$ L/poço de solução 2 N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os resultados foram obtidos em valores de absorbância a 450 nm em leitora de ELISA (Dynex Opsys MR, EUA).

### 3.7.2 *Immunoblotting* 1D e 2D para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium*

Os componentes proteicos do ES de metacestódeos de *T. saginata* e das frações antigênicas (F1 e DEAES2) foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida 1D: 12% (ES e F1); gel gradiente 4-12% (DEAES2); e géis de poliacrilamida 2D: 12% (DEAES2); então, foram transferidos do gel para membranas de nitrocelulose ou PVDF, de acordo com técnica de Towbin, Staehelin e Gordon (1979).

Primeiramente foi realizado o *immunoblotting* 1D para o ES e a fração F1. O sistema de eletrotransferência semi-seco (Hercules, Bio-Rad, EUA) foi utilizado para acondicionar um *sandwich* com papel de filtro, membrana de nitrocelulose (0,20 µm, Bio-Rad) e gel. O *sandwich* foi umedecido em tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 192 nM e metanol 20%) e colocado na cuba de transferência (200 mA, 30 min). Ao término da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%, para confirmar as bandas eletrotransferidas. As membranas foram colocadas em cubas para *immunoblotting* e bloqueadas com PBS-T acrescido 2,5% de leite desnatado (PBS-TM 2,5%) por duas horas, a TA; e depois foram lavadas com PBS-TM 1%. As amostras de soro foram utilizadas na diluição 1/25 em PBS-TM 1% para um volume final de 500 µL/poço. As membranas foram, então, incubadas por 18 horas a 4° C, sob agitação horizontal lenta. Após a incubação, as membranas foram submetidas a cinco ciclos de lavagens de cinco min cada, com PBS-T 0,05%, posteriormente adicionados 500 µL do conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (*whole molecule*, Sigma, EUA) na diluição 1/1500, em PBS-TM 1%. Após duas horas sob agitação lenta à TA, as tiras foram submetidas a cinco ciclos de lavagens com PBS-T 0,05%. O teste foi revelado com *Fast-DAB* (Sigma-Aldrich, EUA) 3,3 diaminobenzidina

(DAB) em PBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por 3 min. Após a visualização das bandas antigênicas, a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada.

Para fração DEAES2, foi realizado o *immunoblotting* 1D e 2D. Após a transferência na mesma condição do ES e da fração F1, membranas de PVDF (0,20 µm, Bio-Rad) foram submetidas a três ciclos de lavagens em PBS-T 0,2% por 5 min cada. Posteriormente foi realizado o bloqueio à TA com PBS-TM 2%, por duas horas. As amostras de líquor diluídas na proporção 1/20 em PBS-TM 2% com Triton X-114 0,2% e incubadas por 18 horas a 4 °C, sob agitação horizontal lenta. Após cinco ciclos de lavagens com PBS-T 0,2% por 5 min cada, adicionou-se o conjugado IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Invitrogen, Life Technologies, EUA) na diluição 1/5000 em PBS-TM 2% com Triton X-114 0,2%. Finalmente, foi realizado quatro ciclos de lavagens com PBS-T 0,2% (5 min/cada) e dois ciclos com PBS (5 min/cada). A reação foi revelada com substrato TMB (Invitrogen, Life Technologies, EUA). Após a visualização das bandas antigênicas, a reação foi interrompida por lavagens sucessivas com água destilada e foi realizada a lavagem com PBS-T 0,2% até eliminação das manchas em excesso.

Os picos do perfil de cada amostra foram comparados ao padrão de massa molecular referência em kiloDalton (kDa) para estimar as massas moleculares relativas. A análise foi realizada utilizando método gráfico pelo programa Image J (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA). As imagens do *immunoblotting* 2D foram analisadas no programa computacional PDQuest (Bio-Rad, EUA) para determinar as massas moleculares aparentes e os pontos isoelétricos. As análises foram realizadas em triplicatas, somente para o *immunoblotting* 2D.

### 3.8 Espectrometria de massas, pesquisa no banco de dados, identificação das proteínas e predição de epítópos

A identificação de proteínas por espectrometria de massas - *mass spectrometry* (MS) foi realizada após seleção de bandas das frações de ES obtidas por gel filtração (F1 e F2) e de *spots* reagentes da fração DEAES2 com base nos melhores parâmetros diagnósticos.

Bandas de gel SDS-PAGE 1D 15 % ou 17% e *spots* de gel SDS-PAGE 2D, corados por *Comassie Brilliant Blue* G-250 coloidal, foram excisados manualmente. O procedimento de preparação de amostras para MS foi realizado de acordo com o protocolo do *Biomolecule Analysis Core Facility* da *University of Texas at El Paso* (UTEP). Em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool metílico, as bandas ou *spots* foram excisadas, o mais precisamente possível. Todos os materiais foram previamente lavados com álcool metílico para diminuir contaminantes. Cada banda ou *spot* foi acondicionado em microtubo de polipropileno (1,5 mL); pré-lavado com acetonitrila, e lavado com acetonitrila (4 x, 5 min) com agitação ocasional, para retirada de detergentes e sais residuais. A acetonitrila foi removida com micropipeta, e as amostras congeladas (-20 °C).

As análises seguintes foram realizadas no Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP) da Universidade Federal de São Paulo (USP, São Paulo), no Laboratório de Espectrometria de Massas. Após digestão enzimática, os peptídeos resultantes foram analisados e sequenciados. A plataforma utilizada pelo CEFAP foi a EASY nanoLC II-LTQ Orbitrap Velos-ETD (Thermo Scientific, EUA) acoplada à técnica de nanocromatografia líquida (EASY-nanoLC II), na qual os peptídeos foram separados em uma coluna com resina de fase reversa C18 (*reversed-phase high performance liquid chromatography* – RP/HPLC). A eluição sequencial dos peptídeos foi realizada em gradiente de acetonitrila por 45 min; e

separados e analisados no espectrômetro de massas (LTQ-Orbitrap Velos ETD, EUA). Os espectros gerados foram processados com as ferramentas computacionais da plataforma, resultando em uma lista, posteriormente, pesquisada contra os bancos de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os resultados obtidos foram selecionados em relação ao gênero *Taenia* e consideradas as identificações de proteínas com maiores *score*, taxa de cobertura e peptídeos únicos.

A predição de epítópos lineares de células B foi realizada pelo método BepiPred disponível na plataforma de recursos *Immune Epitope Database Analysis Resource* (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). Os resíduos de aminoácidos com escores acima do limiar (padrão 0,35) foram previstos como parte de um epítopo. Epítópos preditos com pelo menos três aminoácidos foram considerados.

A modelagem 3D das proteínas na plataforma Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) foi realizada para selecionar os *templates* de estruturas terciárias de proteínas da mesma família depositadas, para a construção dos modelos das proteínas de *Taenia* sp. identificadas. O programa UCSF Chimera (versão 1.10.1) foi aplicado para análises dos gráficos moleculares, especificamente, a apresentação da estrutura terciária com os epítópos preditos marcados em amarelo e sequências não preditas em verde.

### **3.9 Desenvolvimento do imunossensor**

Experimentos preliminares foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia da UFU, sob coordenação do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, para determinar as condições

ótimas para o desenvolvimento de um imunossensor utilizando a fração DEAES2. As reações foram conduzidas à TA ( $25 \pm 1$  °C), utilizando água ultrapura (Direct-Q®3, Merck Milipore, Alemanha) para a preparação das soluções. Para elaboração da sonda, 2  $\mu$ L do extrato antigênico com concentração proteica de 1884  $\mu$ g/mL foram imobilizados, por adsorção física, em eletrodos do tipo *screen-printed* de grafite (C110) (DropSens, Espanha) e incubados por 10 min. As sondas foram lavadas com 100  $\mu$ L de PBS e secas.

Posteriormente, foram adicionados 2  $\mu$ L do indicador 4-DMAA (5 mM/mL) à sonda. Duas condições foram testadas: enriquecimento com compósitos de ZnO com Ag<sub>2</sub>O (ZnO:Ag<sub>2</sub>O) 0,9 e 9%, ambos com concentração de 2000  $\mu$ g/ $\mu$ L. Em seguida, foi realizada a incubação por 20 min, as sondas foram lavadas com 100  $\mu$ L de PBS, secas e feito o bloqueio com BSA 0,5% por 20 min.

Para validação do ensaio, 2  $\mu$ L de amostras de líquor na diluição 1/100 em PBS foram adicionados e incubados por 20 min. Dois *pools* de líquor foram utilizados: um com 10 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado para NC e um, como controle, com 10 amostras de pacientes com outras desordens neurológicas.

Medidas de voltametria de pulso diferencial foram obtidas usando 100  $\mu$ L de PBS como eletrólito. As análises eletroquímicas foram realizadas no potenciómetro PalmSens3 (PalmSens BV, Holanda), na velocidade de 15 mV s<sup>-1</sup> e janela de potencial fixada 0 V a + 0,5 V.

### 3.10 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa computacional GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, EUA). Os dados de ELISA foram submetidos à análise pela

curva *two-graph receiver operating characteristic* (TG-ROC) combinada com a *receiver operating characteristic curve* (ROC) (GREINER, 1995; GREINER; SOHR; GÖBEL, 1995), que determinaram o ponto ótimo (*cut-off*) da reação para cada extrato antigênico analisado. Os resultados da reatividade dos soros e/ou líquor foram expressos em densidade ótica (DO) ou por índice ELISA (IE) – valor de absorbância dividido pelo *cut-off*, para cada extrato antigênico. Consideraram-se como positivas as amostras com IE > 1,0.

Sensibilidade (Se) e especificidade (Es) foram calculados de acordo com Youden (1950), utilizando as seguintes fórmulas:  $Se (\%) = [a / (a + c)] \times 100$  e  $Es (\%) = [d / (b + d)] \times 100$ , onde: (a): verdadeiro positivo, (d): verdadeiro negativo, (b): falso positivo e (c): falso negativo. As diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $P < 0,05$  e intervalos de confiança de 95% foram apresentados para os cálculos de Se, Es e AUC.

Curvas *receiver operating characteristic* (ROC), para descrever índices de eficácia diagnóstica (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003), foram construídas. Área sob a curva ou *area under curve* (AUC), foi calculada, onde: valores próximos a 1 indicam um teste informativo e valores próximos a 0,5 indicam um teste sem informação diagnóstica (HANLEY; McNEIL, 1982). A comparação das AUC entre os extratos antigênicos (ES e F1) utilizando o método descrito por Hanley e McNeil (1983), considerando  $P < 0,05$ , foi realizada.

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

Considerando os dados de ELISA com amostras pareadas de soro e líquor utilizando a fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica em resina aniônica na detecção de

anticorpos IgG anti-*Taenia*, o teste de Wilcoxon (W) não-paramétrico para amostras pareadas foi conduzido (MINEO e colaboradores 2005).

### **3.11 Normas de biossegurança**

Os procedimentos de colheita e manuseio dos materiais biológicos e reagentes, como também a utilização dos equipamentos, foram cumpridos de acordo com as normas de biossegurança descrita por Mineo e colaboradores (2005).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Frações antigênicas de metacestódeos de *T. saginata* obtidas por cromatografia de gel filtração**

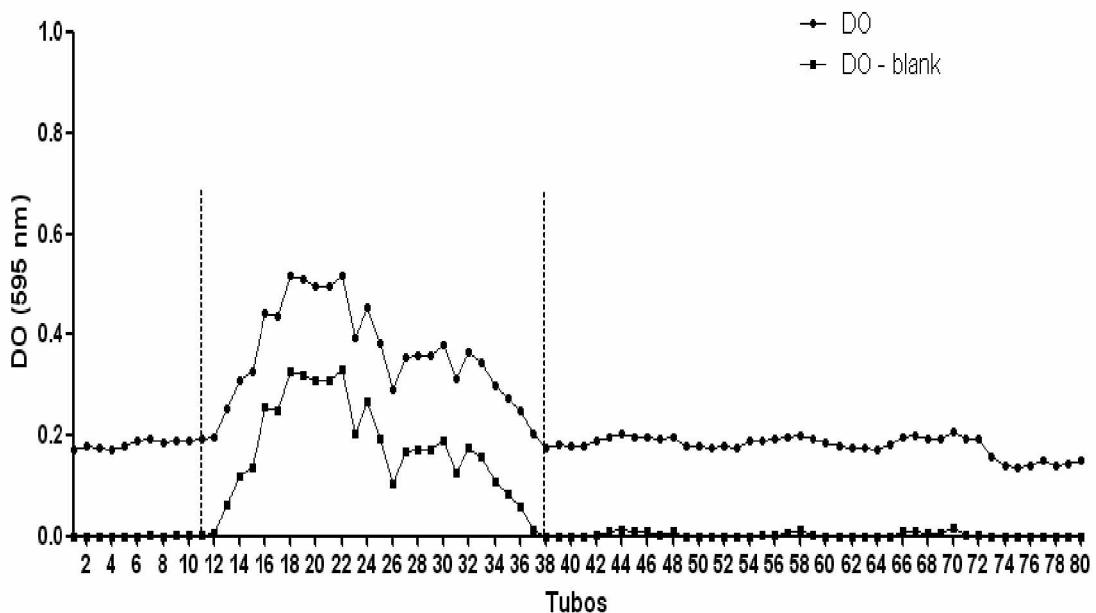
#### **4.1.1 Análise do perfil eletroforético**

O ES apresentava uma concentração proteica de 3560 µg/mL. As frações antigênicas resultantes apresentaram as seguintes concentrações proteicas: F1 - 349 µg/mL e F2 - 931 µg/mL. O cromatograma apontou tubos com presença de polipeptídeos (**Figura 1A**), que foram selecionados para a análise eletroforética (**Figura 1B**). Após observação do perfil de bandas nos géis, as amostras com perfil semelhante foram reunidas agrupadas constituindo as frações antigênicas. Os tubos entre 22-26 foram denominados fração F1 e os tubos 28-34 formaram a F2.

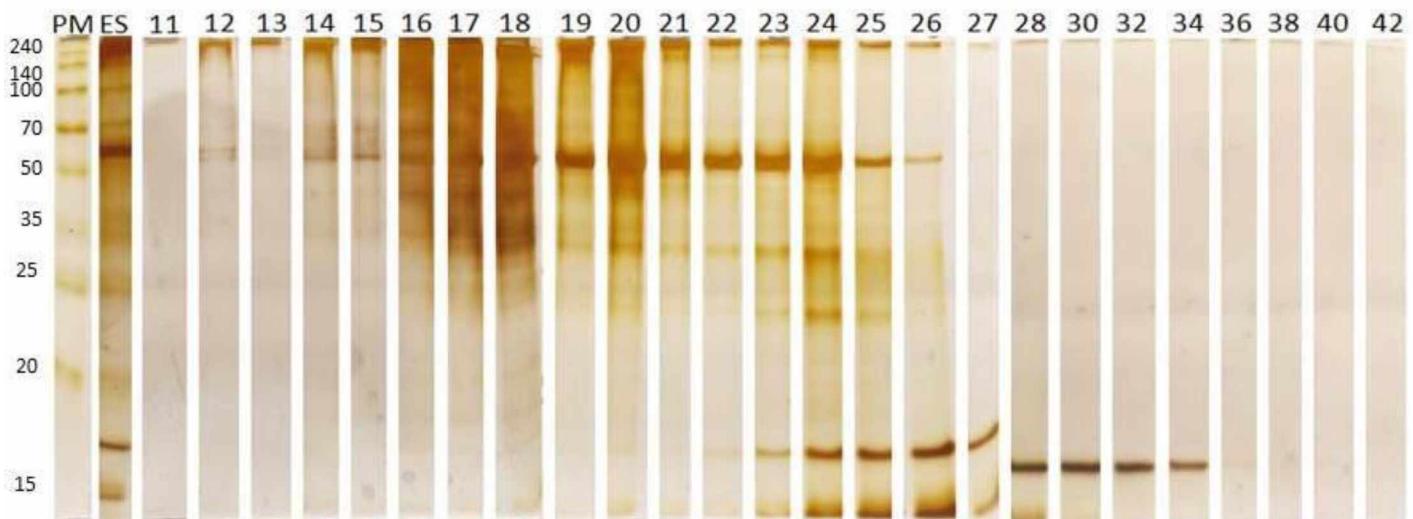
Os perfis eletroforéticos do ES e suas frações antigênicas F1 e F2 foram analisados, depois de submetidos à SDS-PAGE 15% e 17% e corados por coomassie (**Figura 2**). Os ES

mostrou componentes proteicos, com massas moleculares variando entre <15 a 140 kDa. Na fração F1 foi observada bandas com massas moleculares de 12, 20 e 64-68 kDa (região enriquecida). A fração F2 apresentou duas bandas características de 15 e 20 kDa.

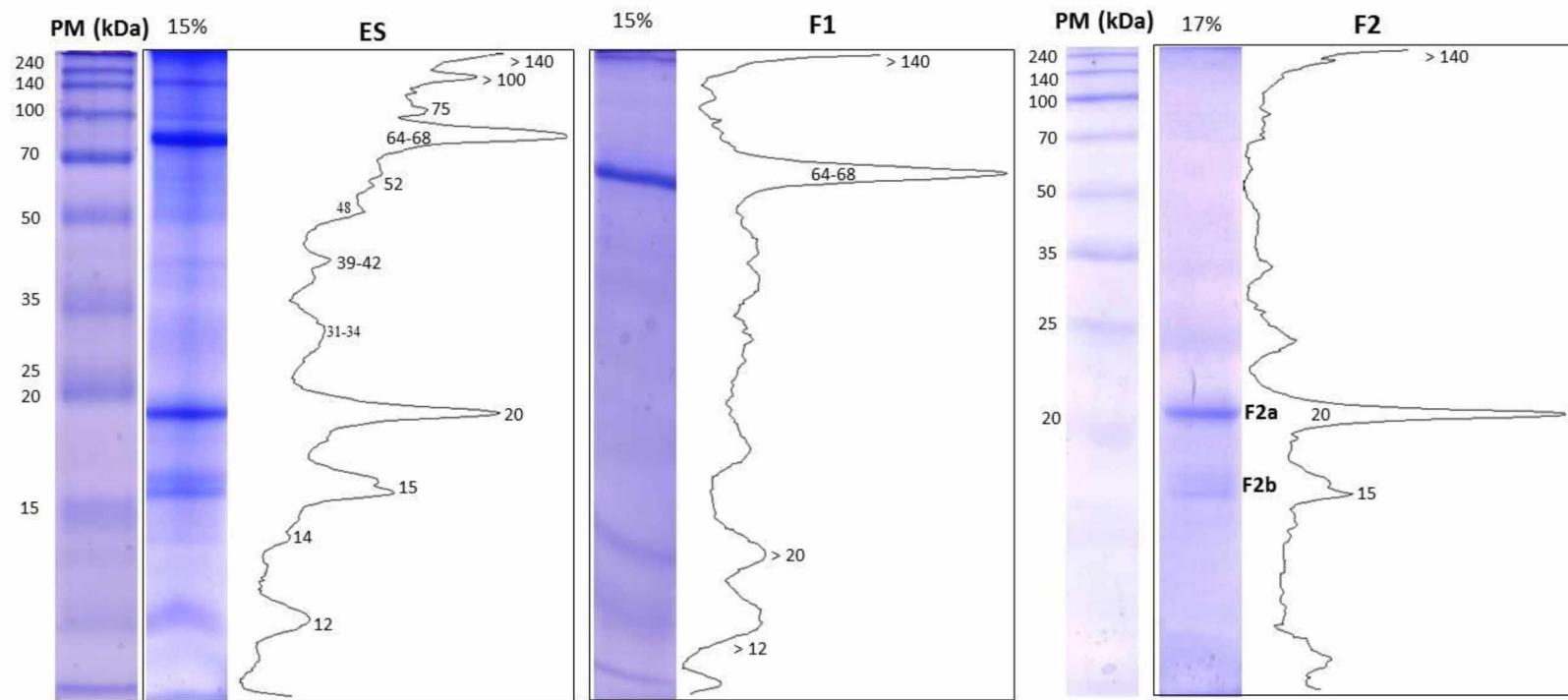
A



B



**Figura 1. (A)** Perfil cromatográfico do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* obtido por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA), leitura realizada pelo método de Bradford (595nm) Blank – tampão de equilíbrio. **(B)** Perfil eletroforético do ES e das amostras representativas obtidas por cromatografia de gel filtração (tubos 11-28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 42), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).



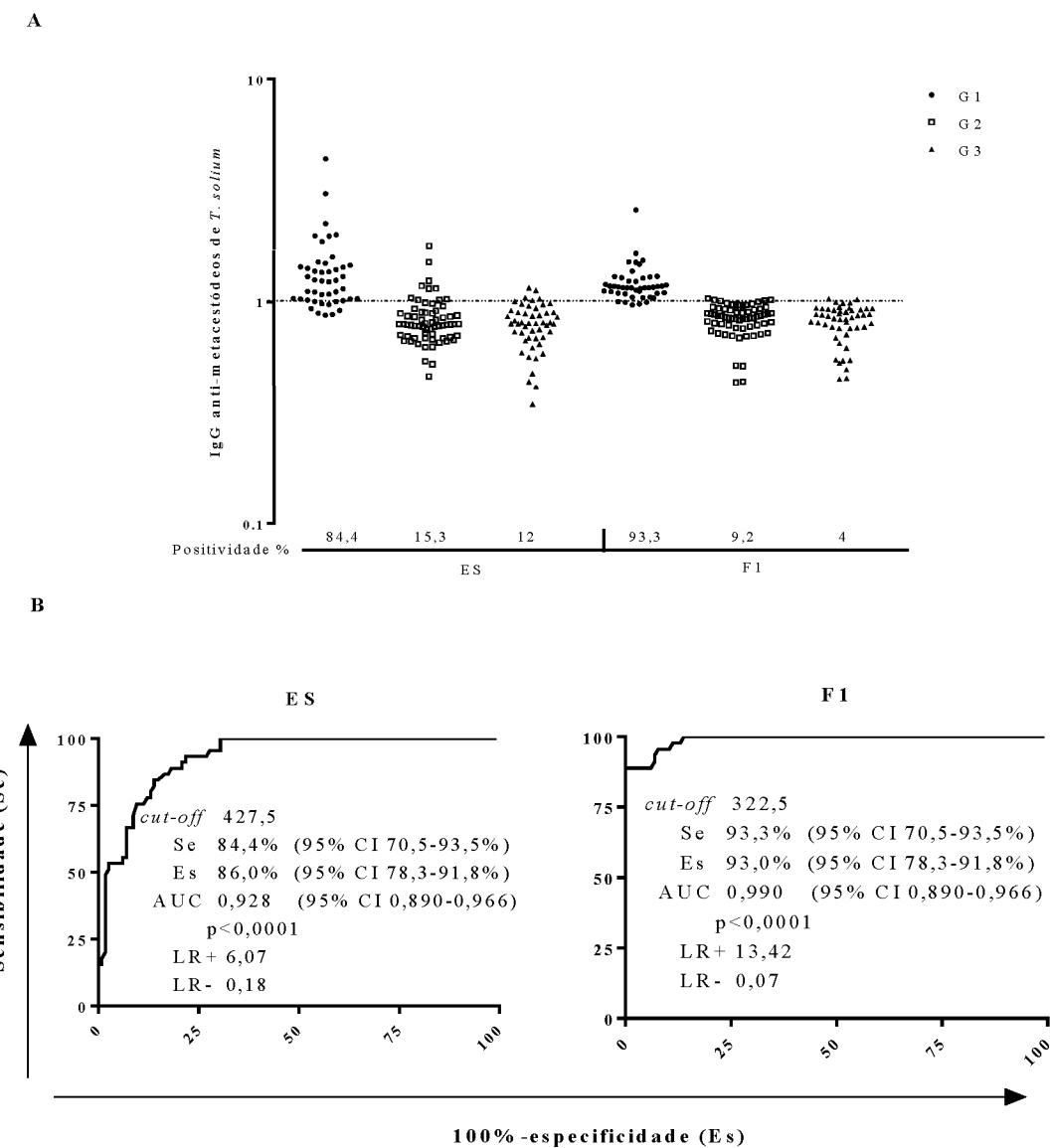
**Figura 2.** Perfis eletroforéticos do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e frações obtidas após cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). Frações (F) definidas de acordo com o perfil observado nos tubos (Figura 1). F1 – tubos 22 ao 26, F2 – tubos 28 ao 34, SDS-PAGE 15% e 17%, corados por azul de Coomassie. PM - padrão de peso molecular (kDa).

#### 4.1.2 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* por ELISA

##### 4.1.2.1 ES e fração antigênica F1

A **Figura 3A** mostra a reatividade no ELISA das amostras de soro frente as duas preparações antigênicas (ES e F1). As taxas de positividade para o ES e F1 foram, respectivamente: 84,4% (38/45) e 93,3% (42/45) no G1; 15,3% (10/65) e 9,2% (6/65) no G2 e 12% (6/50) e 4% (2/50) no G3. As reatividades cruzadas no G2, quando se utilizou o ES, foram devido as amostras de soro de pacientes infectados com anciostomatídeos (2/7), *S. mansoni* (1/4), *S. stercoralis* (2/8), *G. lamblia* (2/8), *E. histolytica/dispar* (1/2), *H. nana* + *E. vermicularis* (1/1) e *E. granulosus* (1/8). Quando a fração F1 foi testada, a reatividade cruzada aconteceu nas amostras de pacientes infectados com anciostomatídeos (1/7), *S. stercoralis* (1/8), *E. histolytica/dispar* (2/2), *Taenia* sp. (1/1) e *E. granulosus* (1/8).

A fração antigênica F1 alcançou os melhores parâmetros diagnósticos (**Figura 3B**). Comparando as curvas ROC, a F1 foi mais eficiente para distinguir pacientes com NC (G1) daqueles dos grupos controle (G2 e G3), alcançando um alto valor de AUC (AUC = 0,990;  $z = -3,6$ ;  $P = 0,0003$ ). O valor de LR+ para o ES ( $LR+ = 6,07$ ) indicou apenas uma moderada probabilidade de um caso verdadeiramente positivo de NC, enquanto que para F1 este índice mostrou um alto valor diagnóstico ( $LR+ = 13,42$ ). Esta eficiência pode ser corroborada quando se analisa o valor de LR- ( $LR- = 0,07$ ), este parâmetro, quando  $< 0,1$  virtualmente exclui a chance de infecção (JAESCHKE et al., 1994).



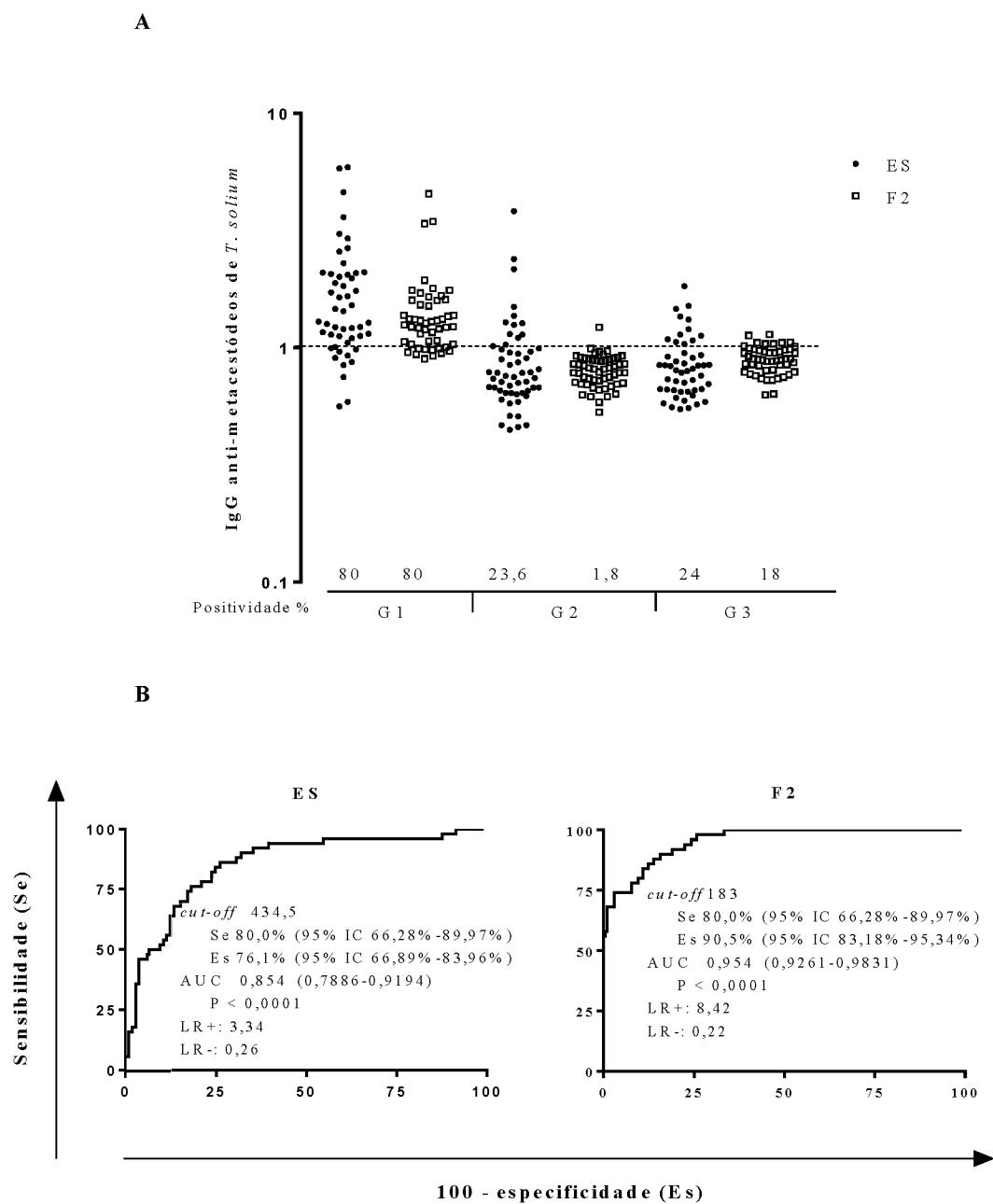
**Figura 3. (A)** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=45), outras infecções parasitárias (G2; n=65) e indivíduos saudáveis (G3; n=50), utilizando o extrato salino (ES) de metacostódeos de *Taenia saginata* e a fração F1 obtida por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA), Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1). **(B)** Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) utilizando o ES e a fração F1 obtida por cromatografia de gel filtração.

#### 4.1.2.2 ES e fração antigênica F2

O painel de soros caracterizado no item **3.2.1.2** foi avaliado pelo ELISA utilizando o ES e sua fração antigênica F2, obtidas por cromatografia de gel filtração (**Figura 4**). No G1, pacientes com NC, 80% das amostras foram positivas para o ES e F2. No G2, com outras infecções parasitárias, 23,6% das amostras de soro foram positivas para o ES e 1,8% para F2. No G3, com indivíduos saudáveis, a positividade foi de 24% para ES e 18% para F2.

A reatividade cruzada no G2 ( $IE > 1$ ), quando testada a fração F2, foi observada apenas em uma amostra de soro de *H. nana* (1/55). No entanto, para o ES, foram observadas 13 amostras de soro de pacientes falso positivos no G2: ancilostomídeos (4/55), *S. mansoni* (1/55), *A. lumbricoides* (1/55), *S. stercoralis* (2/55), *G. lamblia* (1/55), *E. vermicularis* (1/55), *E. histolytica/díspar* (1/55), ancilostomídeo + *A. lumbricoides* (1/55) e *Taenia* sp (1/55) (**Figura 4A**).

O teste ELISA utilizando a fração F2 apresentou melhores parâmetros de diagnóstico (Se: 80,0%; Es: 90,5%; AUC: 0,954; LR+: 8,42 e LR-: 0,22), em relação ao ES (**Figura 4B**).

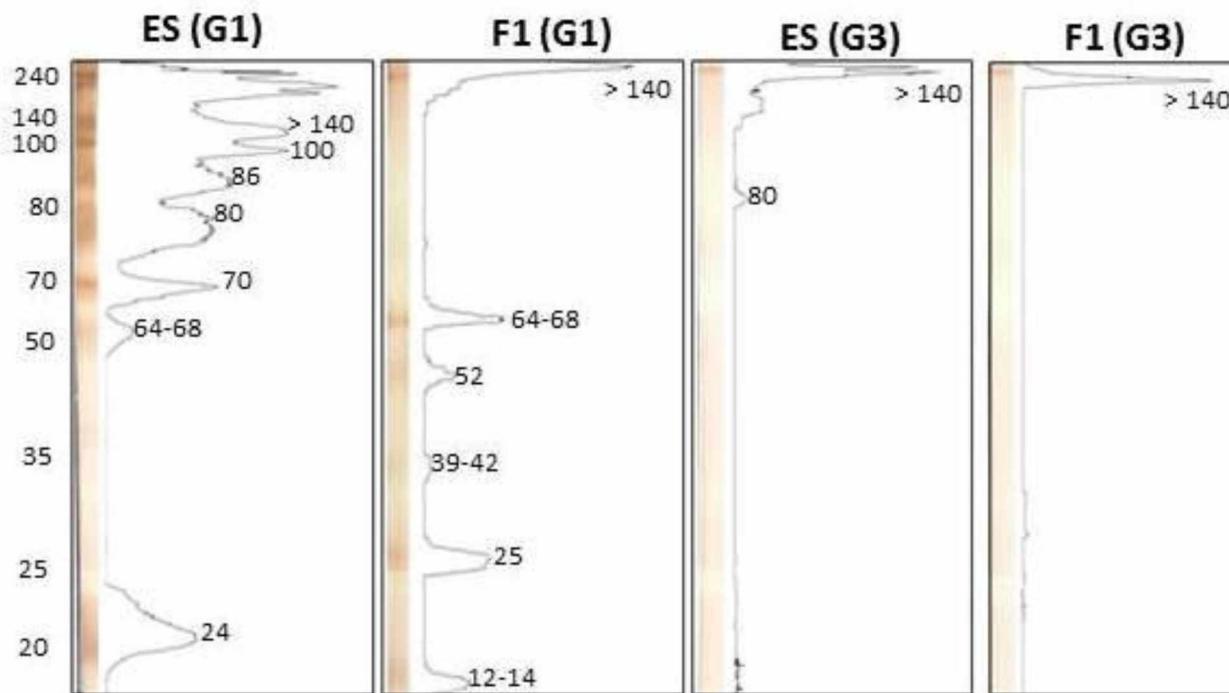


**Figura 4. (A)** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro de pacientes com NC (G1; n=50), outras infecções parasitárias (G2; n=55) e indivíduos saudáveis (G3; n=50), utilizando o extrato salino (ES) de metacostódeos de *Taenia saginata* e a fração F2 obtida por cromatografia em resina de gel filtração S-100 (Sephadryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, EUA). Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1). **(B)** Curva ROC indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*; LR) utilizando o ES e a fração F2 obtida por cromatografia de gel filtração.

#### **4.1.3 *Immunoblotting* 1D para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium***

##### **4.1.3.1 ES e fração antigênica F1**

A **Figura 5** mostra o perfil de reatividade no *immunoblotting*, quando o ES e a fração F1 foram utilizados. Foi utilizado um *pool* de 10 amostras mais reativas no teste ELISA, para o ES e F1 (G1) e outro *pool* com a mesma quantidade de amostras menos reativas no teste ELISA para o ES e F1 (G3). Para o ES no G1, as seguintes proteínas imunodominantes foram reconhecidas: 24, 64-68, 70, 80, 86, 100 e  $\geq 140$  kDa. Para F1 houve reconhecimento das seguintes bandas: 12-14, 25, 39-42, 52, 64-68 e  $\geq 140$  kDa. Não houve reconhecimento de bandas relacionadas ao diagnóstico da NC quando se utilizou o *pool* de amostras de soro do G3 para ambas as preparações antigênicas. A banda de 64-68 kDa, uma importante marcador para o diagnóstico da NC que foi reconhecida quando se utilizou o ES e a fração F1.



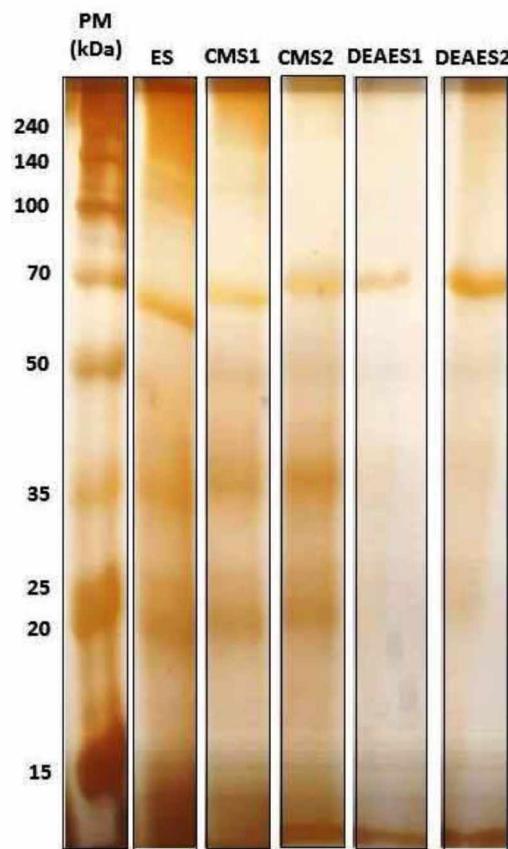
**Figura 5.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em pool de amostras de soro de pacientes com NC (G1) e indivíduos saudáveis (G3), utilizando o extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES) e a fração antigênica F1, obtida por cromatografia de gel filtração. Picos de intensidade, indicam as bandas detectadas pelo programa Image J (versão 1.44, National Institutes of Health, EUA). PM - padrão de peso molecular (kDa).

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

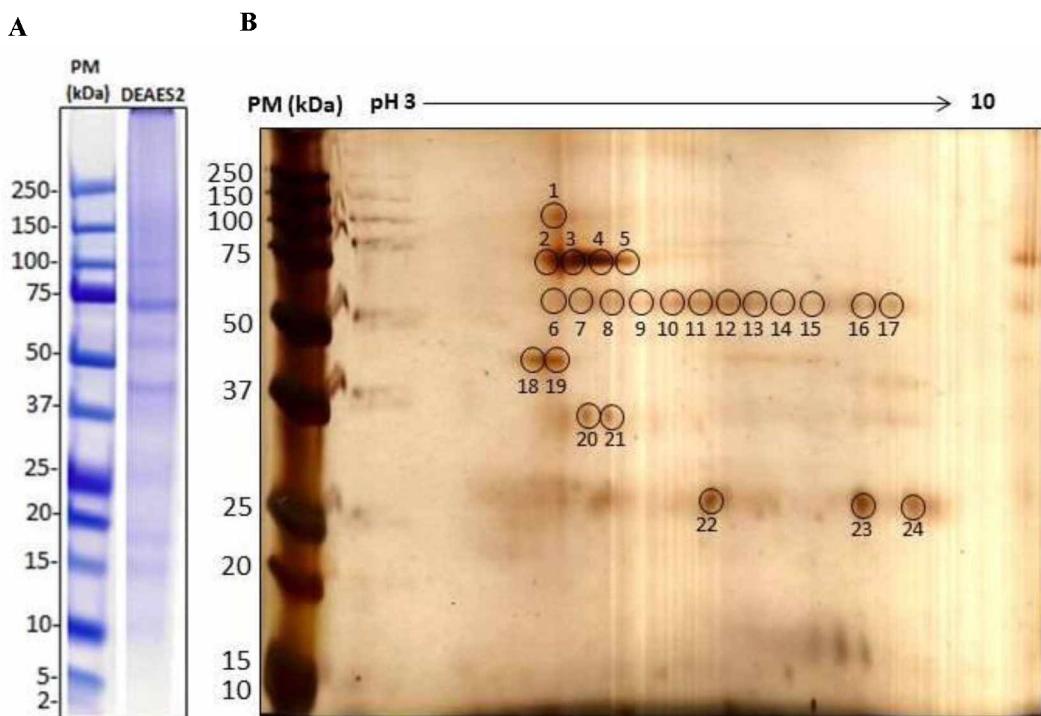
### 4.2.1 Análise do perfil eletroforético

Os perfis eletroforéticos do ES de metacestódeos de *T. saginata* e suas frações antigênicas: CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2, foram analisados, depois de submetidos à SDS-PAGE 12% e corados por nitrato de prata (Figura 6). O ES revelou bandas, com massas moleculares entre <15 a 140 kDa. Na fração CMS1 foi observada bandas com massas moleculares variando de 24 a 140 kDa. A fração DEAES1 revelou banda com massa proteica de 64-68 kDa, com menor intensidade de marcação. A fração CMS2 apresentou uma porção enriquecida variando de 20 a 70 kDa. Bandas com massas moleculares de 64-68 kDa, foi observado em todas frações antigênicas.

O perfil eletroforético 1D da fração DEAES2 foi realizado, em gel de poliacrilamida gradiente (4-12%), corado por Azul de Coomassie. Bandas com peso molecular variando de 40-70 kDa foram visualizadas (Figura 7A). O perfil eletroforético 2D da fração DEAES2 foi realizado em gel de poliacrilamida 12%, corado por nitrato de prata (Figura 7B). Análises realizadas pelo PDQuest (Bio-Rad, EUA), identificaram 24 *spots* característicos, com variação de pH de 3-10 e peso molecular de 25 a 100 kDa.



**Figura 6.** Perfil eletroforético do extrato salino de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), e das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS1, DEAES1 e DEAES2), em SDS-PAGE a 12%, corado por nitrato de prata. PM - padrão de peso molecular (kDa).



**Figura 7.** Perfil eletroforético 1D e 2D da fração DEAES2 do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* (ES), obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose. **(A)** Gel 1D, em SDS-PAGE 4-12%, corado por Azul de Coomassie. **(B)** Gel 2D, em SDS- PAGE 12%, analisado pelo PDQuest (Bio-Rad) e corado por nitrato de prata. Aproximadamente 70 µg de proteína foram utilizadas para reidratar a tira de IPG (Gradiente de pH imobilizado) de 7 cm, não-linear, pH 3-10. Um total de 24 *spots* foram identificados e numerados (1-24). PM -padrão de peso molecular (kDa).

#### 4.2.2 Detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* por ELISA

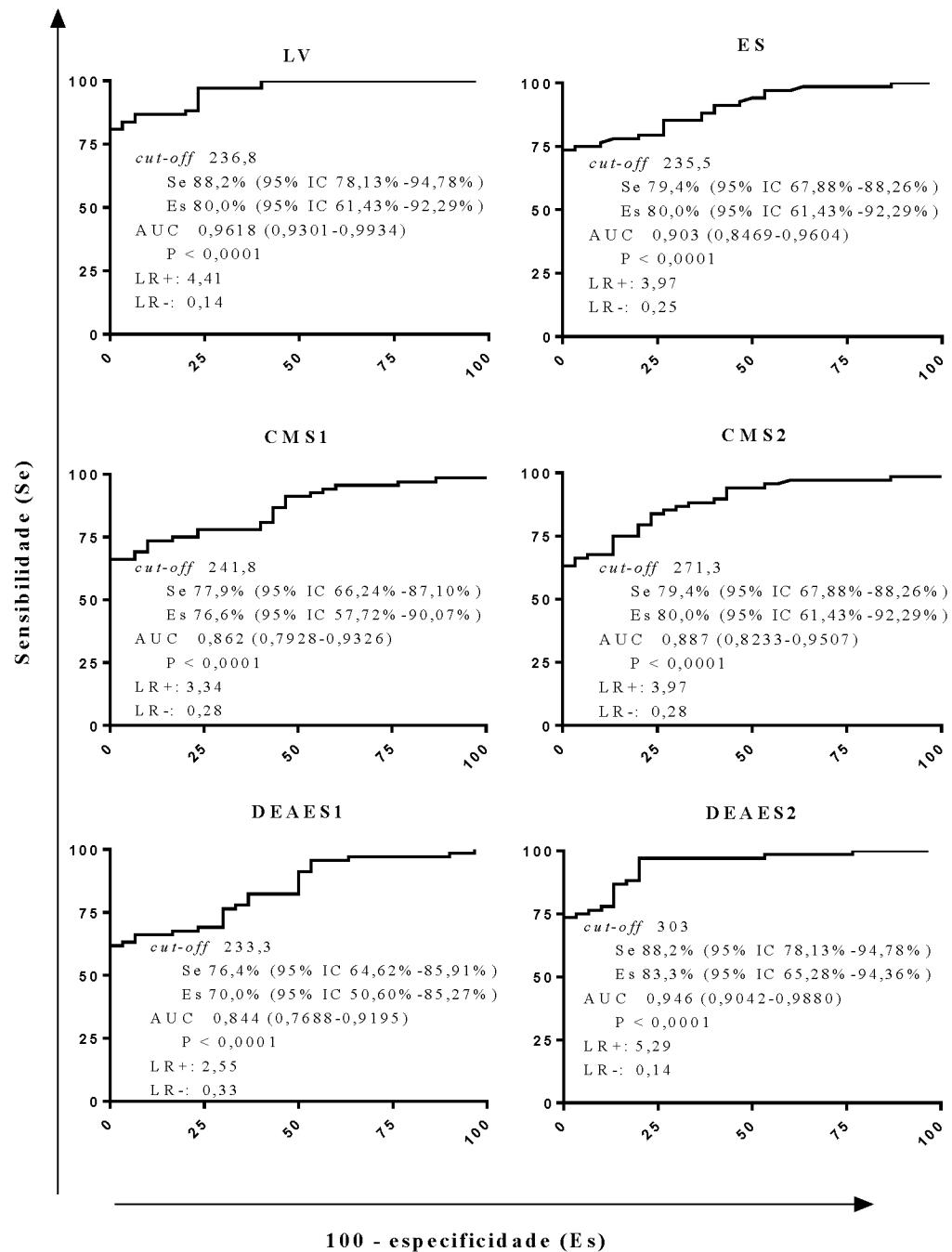
##### 4.2.2.1 ES, LV e frações antigênicas CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2

A reatividade das frações antigênicas obtidas por cromatografia de troca iônica foram testadas por ELISA, utilizando amostras pareadas de líquor e soro de pacientes, de área endêmica do México, com o objetivo de comparar a reatividade na detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* frente ao ES, suas frações antigênicas e o LV de metacestódeos de *T. solium*. Os resultados dos parâmetros de diagnósticos estão mostrados na **Figura 8** (soro) e **Figura 9** (líquor). Dentre as frações testadas, DEAES2 destacou-se por apresentar resultados satisfatórios utilizando amostras pareadas de soro e líquor e comparando com o antígeno padrão ouro no México (LV de *T. solium*).

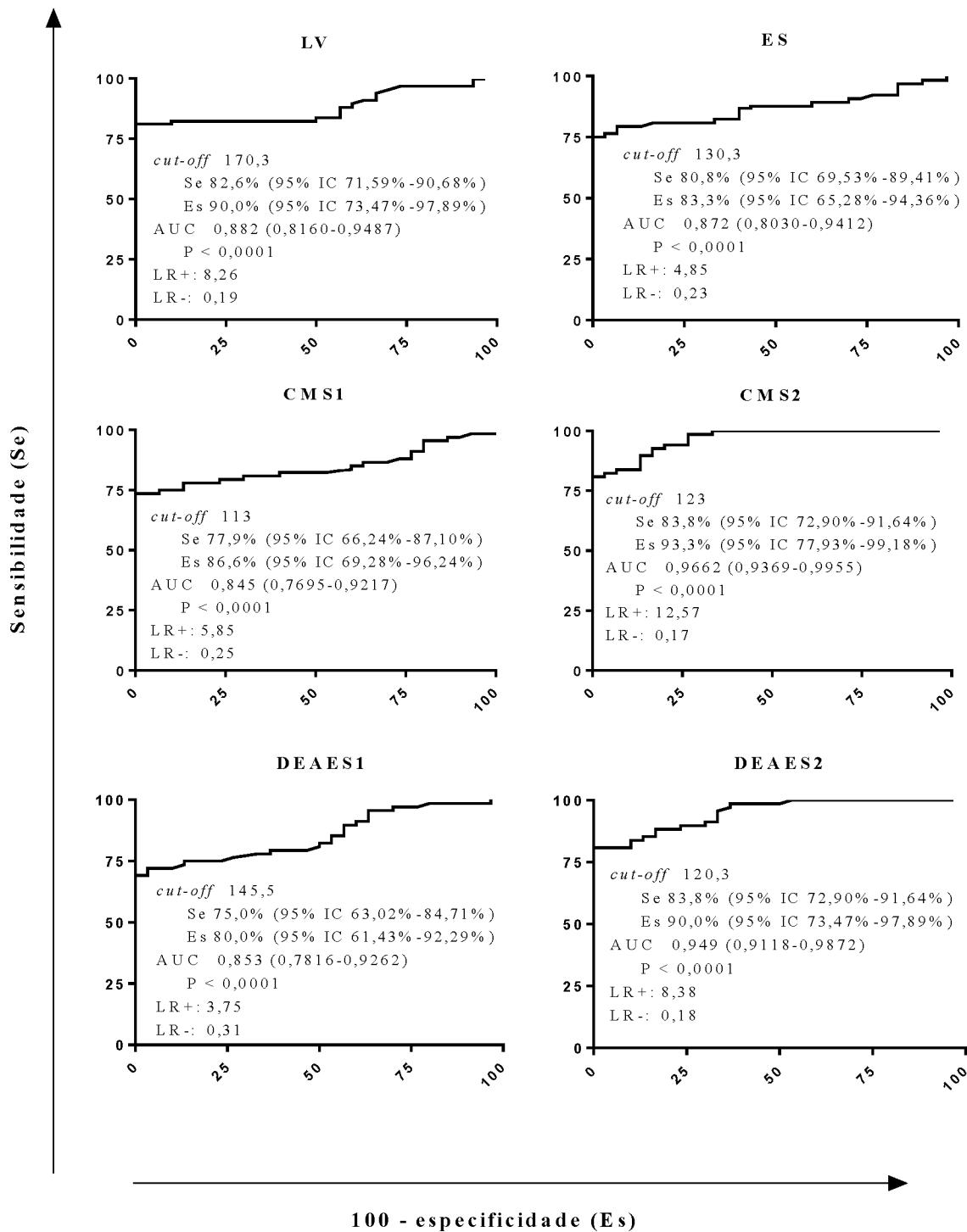
Quando testadas amostras de soro os parâmetros de diagnóstico de DEAES2 foram similares ou melhores ao LV (Se: 88,2% e 88,2%; Es: 83,3% e 80%; AUC: 0,946 e 0,961; LR+: 5,29 e 4,41; LR-: 0,14 e 0,14, respectivamente). Em amostras de líquor a fração CMS2 obteve ótimos parâmetros de diagnóstico, entanto a fração DEAES2 foi escolhida para os ensaios posteriores de *immunoblotting*, MS e desenvolvimento de imunossensor, por manter os índices nas amostras pareadas de soro e líquor.

Na **Figura 10**, são apresentadas as taxas de positividades do ELISA utilizando a fração DEAES2. No G2 a taxa de positividade foi de 16,7% (5/30) em amostras de soro e 10% (4/30) em amostras de líquor. Essas amostras são de indivíduos com fistula liquórica (2/30-soro), doença desmielinizante (1/30-soro e 4/30-líquor), hidrocefalia (1/30 - soro) e papiledema (1/30-soro). Considerando o IE de anticorpos IgG anti-*Taenia* em amostras de soro e líquor o teste de Wilcoxon (W) não-paramétrico para amostras pareadas foi conduzido. Nos grupos amostrais para amostras pareadas de soro e líquor, houve diferença estatística ( $P < 0,001$ )

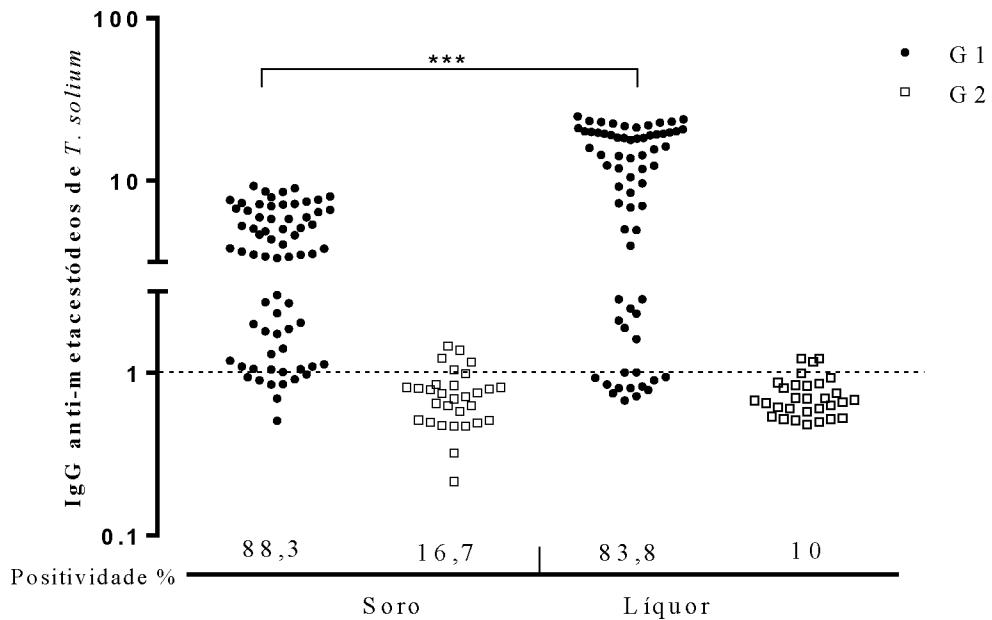
(G1-soro e líquor) e não houve diferença estatística (G2-soro e líquor) entre níveis de IgG anti-metacestódeos de *T. solium*.



**Figura 8.** Curvas ROCs indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*: LR+ e LR-) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacestódeos de *Taenia solium* em amostras de soro, utilizando líquido de vesícula (LV) extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* e suas frações obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).



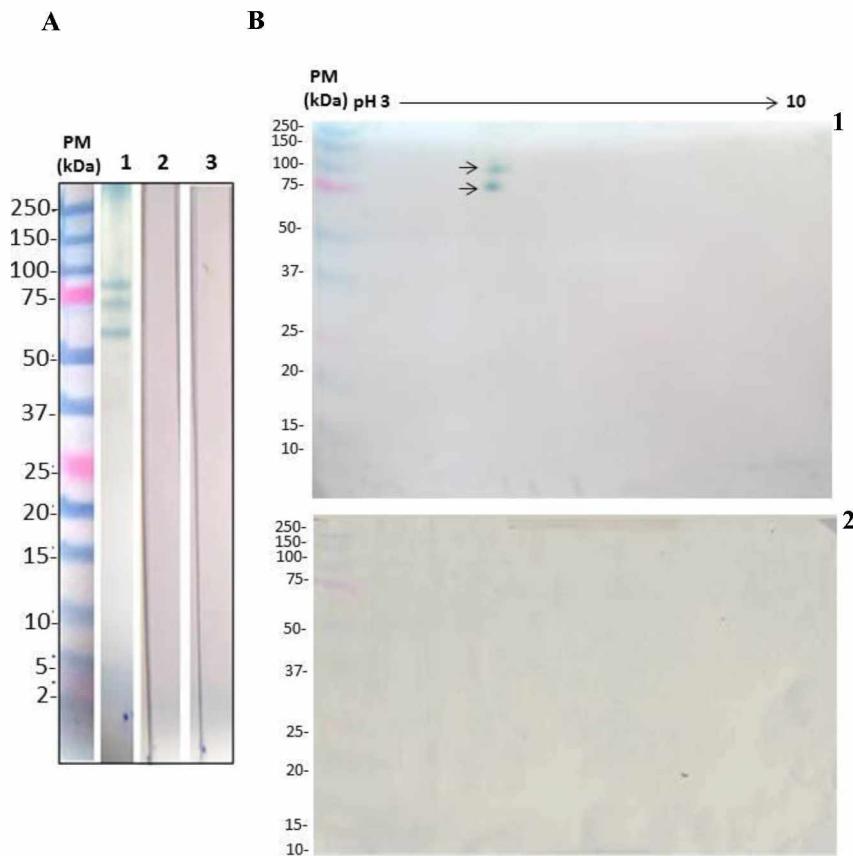
**Figura 9.** Curvas ROCs indicando o ponto ótimo da reação (*cut-off*), sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (*area under curve*; AUC) e razão de verossimilhança (*likelihood ratio*: LR+ e LR-) para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de líquor, utilizando líquido de vesícula (LV) extrato salino (ES) de metacostódeos de *Taenia saginata* e suas frações obtidas por cromatografia de troca iônica (CMS1, CMS2, DEAES1 e DEAES2).



**Figura 10.** ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-mestacostódeos de *Taenia solium* em amostras de soro e líquor de pacientes com NC (G1; n=68) e outras desordens neurológicas (G2; n=30), utilizando a fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica. Linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA >1). \*\*\* P < 0,001.

#### 4.2.3 Immunoblotting 1D e 2D para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de líquor

A **Figura 11A** demonstra o perfil de reconhecimento dos *spots* utilizando *pool* (cinco amostras) de líquor de pacientes com NC (1), indivíduos falsos positivos (2) e com outras desordens neurológicas (3), com a fração DEAES2. Três bandas foram reagentes com peso molecular variando de 55-75 kDa, foram identificadas, em pacientes com NC. Não houve reconhecimento de bandas em indivíduos falsos positivos e negativos. Na **Figura 11B(1)** dois *spots* com *pI* 5,4 e >75 kDa demostram *spots* específicos. Quando se testou indivíduos falsos positivos, não houve revelação de *spots* [**Figura 11B(2)**].



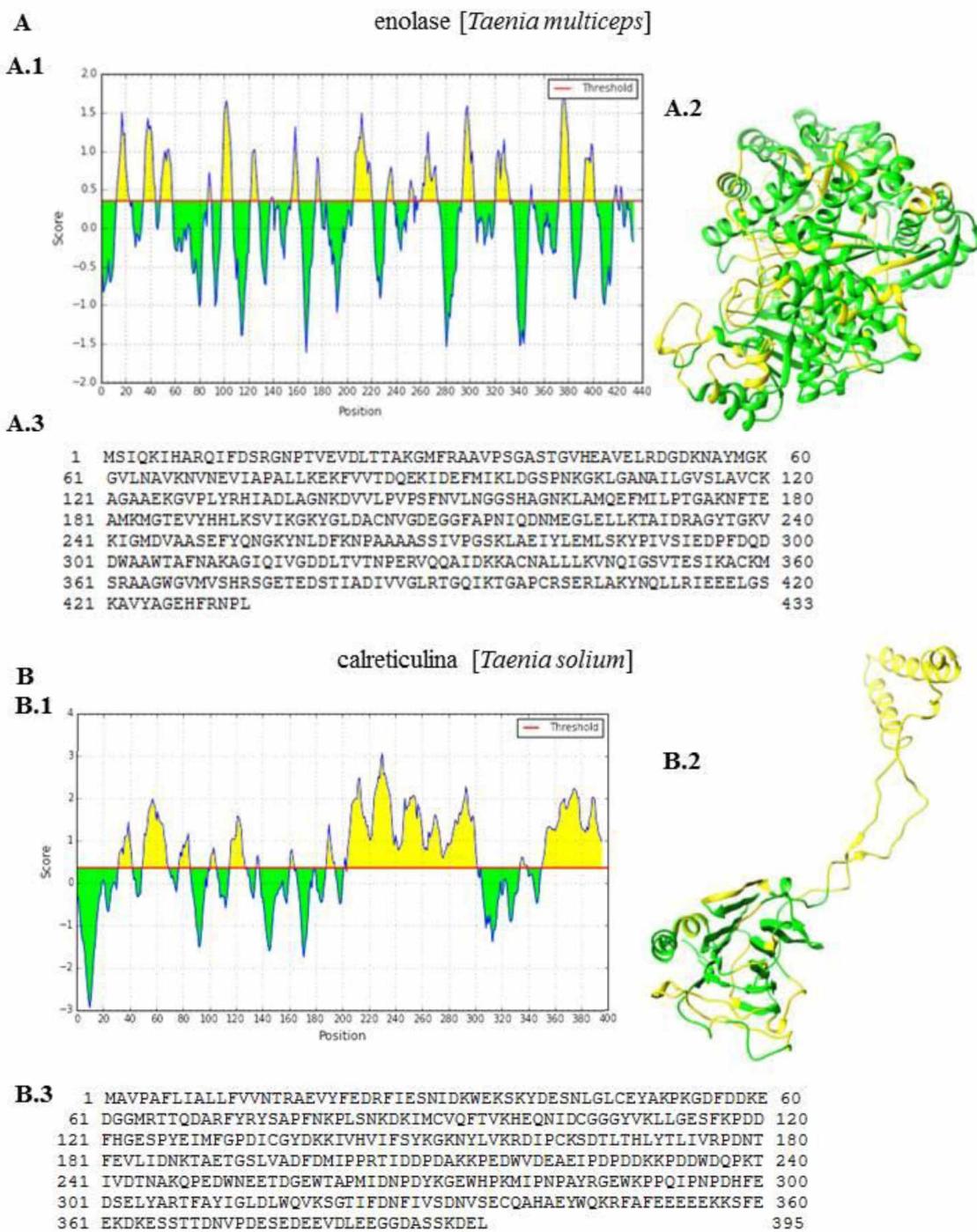
**Figura 11.** *Immunoblotting* para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *Taenia solium*, utilizando a fração antigênica DEAES2 de metacestódeos de *Taenia saginata*, obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose. **(A)** *Immunoblotting* utilizando pool de líquor de pacientes com NC (1), indivíduos falsos positivos (2) e indivíduos com outras desordens neurológicas (3), em gel unidimensional gradiente (SDS-PAGE), 4-12%. **(B)** *Immunoblotting* utilizando pool de líquor de pacientes com NC (1) com outras desordens neurológicas (2), em gel bidimensional (2D-PAGE), 12%. PM - padrão de peso molecular (kDa).

#### 4.3 Identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS) e predição de epítópos

##### 4.3.1 Fração antigênica F1 obtida por cromatografia de gel filtração

A identificação de proteínas de interesse diagnóstico da NC por espectrometria de massa foi realizada após seleção da fração F1 a partir dos testes ELISA e *immunoblotting* 1D. Na F1 a banda de 64-68 kDa (banda diagnóstica descrita na literatura para NC) foi selecionada. A **Figura 12 (A e B)** apresenta as proteínas de interesse diagnóstico para a NC identificadas por MS. A **Tabela 1** apresenta as proteínas identificadas de acordo com o escore, peptídeos únicos e taxa de cobertura.

Considerando a ausência da sequência completa da enolase de *T. solium* e a estrutura conservada desta proteína no gênero *Taenia*, utilizou-se a estrutura da mesma proteína em *T. multiceps* para realizar análise *in silico* para predição de epítópos de célula B. Para a enolase (*T. multiceps*) 18 epítópos foram preditos (**Figuras 12A.1**). Para a proteína calreticulina (*T. solium*) 10 epítópos foram preditos (**Figuras 12B.1**). Os epítópos de célula B são mostrados na modelagem 3D em amarelo (**Figuras 12A.2 e 12B.2**). As sequências das proteínas identificadas em F1 são mostradas nas **Figuras 12A.3 e 12B.3**. A proteína enolase, apresentou pl 7,19; taxa de cobertura de 20,32 e foram lidos sete peptídeos únicos. A proteína calreticulina, obteve uma taxa de cobertura de 30,13; com oito peptídeos únicos analisados e pl 4,56 (**Tabela 1**).



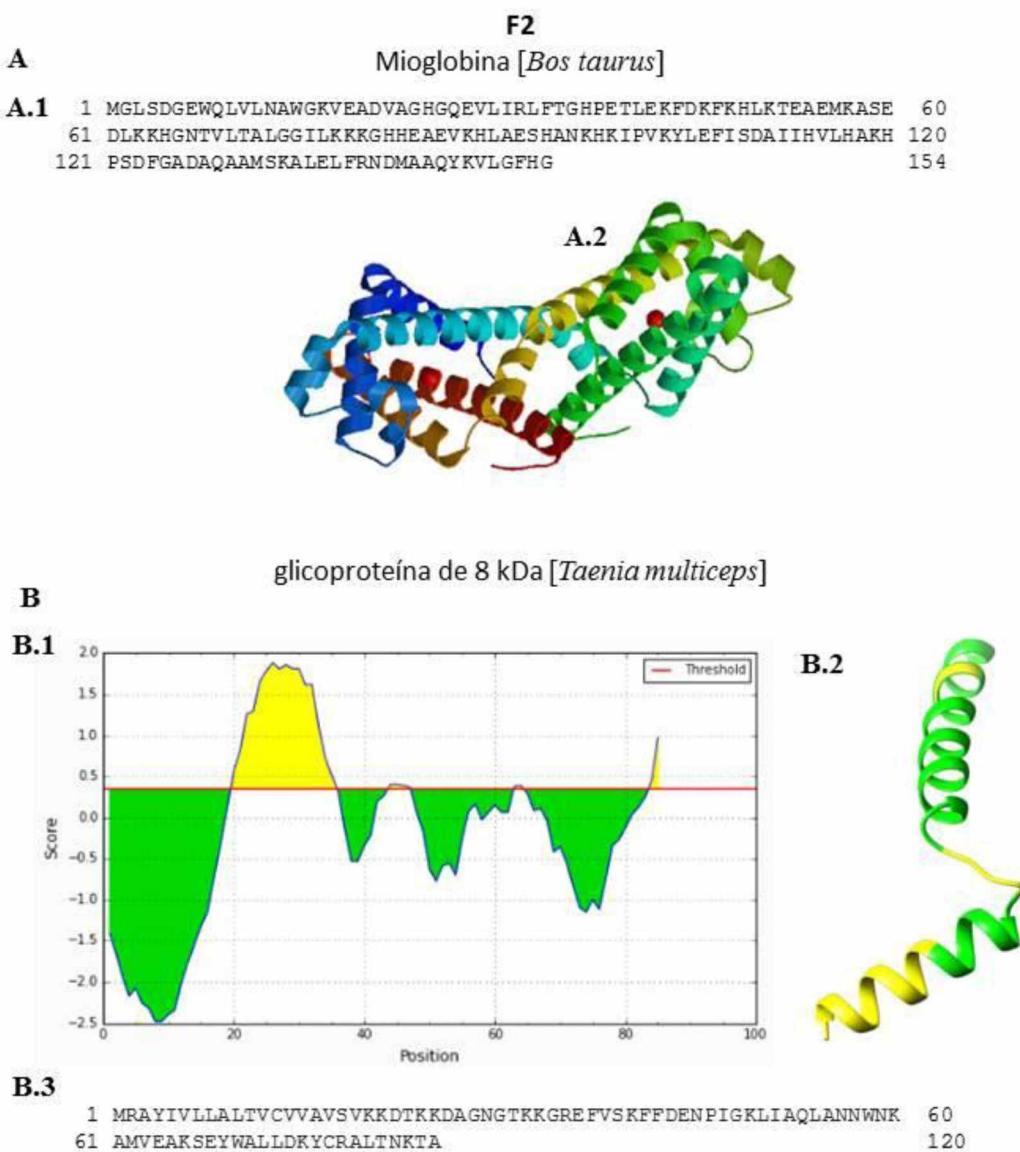
**Figura 12.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração F1 obtida por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100) **(A)** enolase (*Taenia Multiceps*) e **(B)** calreticulina (*Taenia solium*). **(A.1 e B.1)** Predição de epítopenos lineares de células B pelo *BepiPred*. Resíduos de aminoácidos são coloridos em amarelo no gráfico quando atingem escores acima do limiar (*threshold*; 0,35), o eixo X corresponde às posições dos resíduos na sequência (*position*) e eixo Y *score*. **(A.2 e B.2)** Estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa, da estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*), onde epítopenos de célula B preditos são mostrados em amarelo e epítopenos não preditos em verde. **(A.3 e B.3)** Sequência da proteína identificada.

#### 4.3.2 Fração antigênica F2 obtida por cromatografia de gel filtração

A identificação de proteínas de interesse diagnóstico da NC por MS foi realizada após seleção da fração F2 a partir do teste ELISA para detecção de IgG. Na fração F2 duas bandas proteicas foram selecionadas aleatoriamente para análise: F2a – 20 kDa e F2b – 15 kDa. A MS identificou duas proteínas: mioglobina [*Bos taurus*] (F2a) e glicoproteína de 8 kDa [*T. multiceps*] (F2b) (**Tabela 1**).

A **Figura 13 (A e B)** mostram as proteínas identificadas por MS. Na **Figura 13A.1** visualiza-se a sequência da proteína mioglobina e, em **13A.2**, sua estrutura terciária. A proteína é específica do hospedeiro intermediário, mostrando a internalização de proteínas do hospedeiro pela forma larval do parasito.

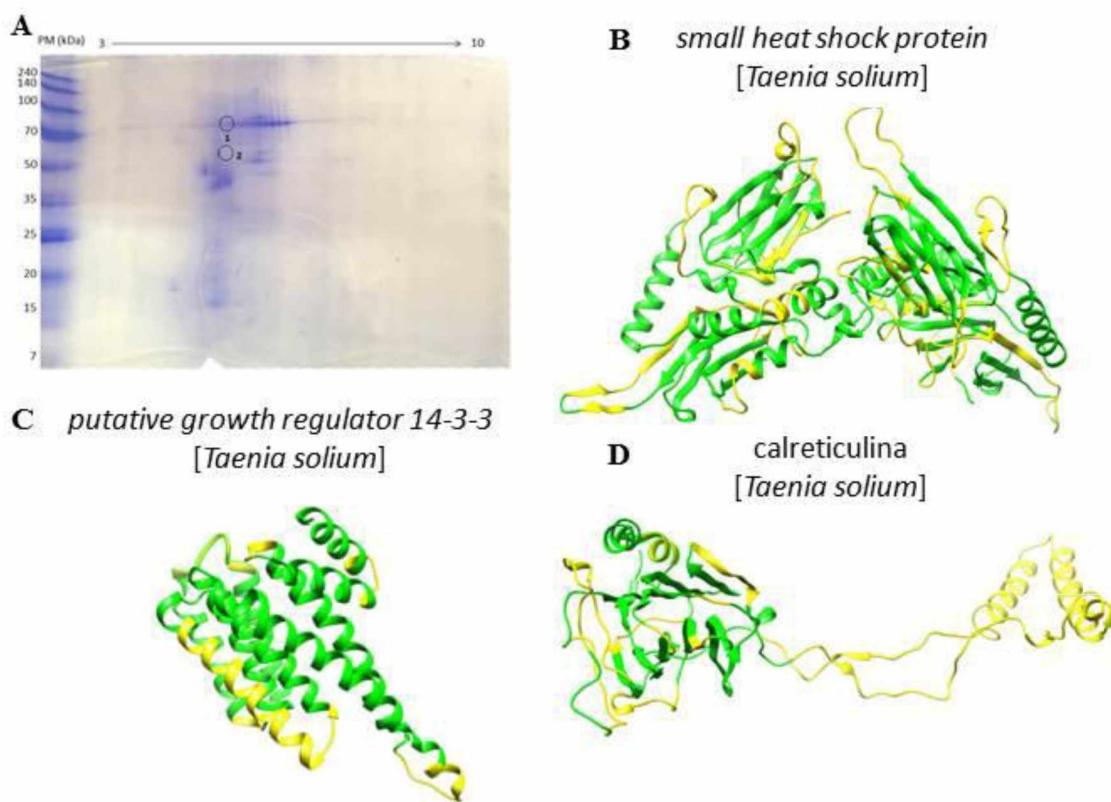
A glicoproteína de 8 kDa identificada em F2, possui 85 aminoácidos, taxa de cobertura de 43,53; cinco peptídeos únicos lidos (IAQLAKDWKEAmVEAR; SIKNGIEFVHK; VRAALAEYIR; AALAEYIR; DWKEAmVEAR); peso teórico de 9,4 kDa e pl 9,31 (**Tabela 1**). Três epítopos foram preditos (**Figuras 13B.1**). Os epítopos de célula B são mostrados na modelagem 3D em amarelo (**Figuras 13B.2**). A sequências da proteína identificada em F2b é mostrada na **Figura 13B.3**.



**Figura 13.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração F2 obtida por cromatografia de gel filtração (Sephacryl S-100) **(A)** mioglobina (*Bos taurus*) e **(B)** glicoproteína de 8 kDa (*Taenia multiceps*). **(A.1)** sequência da proteína identificada e **(A.2)** estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*). **(B.1)** Predição de epítópos lineares de células B pelo *BepiPred*. Resíduos de aminoácidos são coloridos em amarelo no gráfico quando atingem escores acima do limiar (*threshold*; 0,35), o eixo X corresponde às posições dos resíduos na sequência (*position*) e eixo Y *score*. **(B.2)** Estrutura tridimensional, obtida por modelagem comparativa, da estrutura terciária da proteína (*UCSF Chimera*), onde epítópos de célula B preditos são mostrados em amarelo e epítópos não preditos em verde. **(B.3)** Sequência da proteína identificada.

#### 4.3.3 Fração antigênica DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica

Com a finalidade de identificação de proteínas específicas para o diagnóstico da NC, a fração DEAES2 foi resolvida em gel bidimensional (**Figura 14**). Dois *spots* (1-pl 5,4; > 70 kDa e 2-pl 5,4; > 50kDa) foram selecionados a partir da análise do *immunoblotting* 2D, (**Figura 14A**), excisados e enviados para análise por MS. Os critérios para seleção e identificação de promissoras proteínas foram: pl com faixa de inclusão de +/- 1, inclusão de proteínas pertencentes a espécies do gênero *Taenia*, proteínas identificadas nos dois *spots*, exclusão de proteínas com peso molecular fora da faixa dos *spots* selecionados e de proteínas estruturais do parasito. Três proteínas consideradas promissoras dentro dos critérios foram identificadas e selecionadas: *small heat shock* [*T. solium*] (*spots* 1 e 2); *putative growth regulator 14-3-3* [*T. solium*] (*spots* 1 e 2) e *calreticulina* [*T. solium*] (*spots* 1 e 2) (**Tabela 1**). Os epítopos de célula B foram preditos e são observados em amarelo nas estruturas tridimensionais das proteínas identificadas (**Figuras 14B, C e D**). As proteínas *small heat shock*, *putative growth regulator 14-3-3* e *calreticulina*, apresentaram 12, 7 e 10 epítopos de célula B preditos, respectivamente.



**Figura 14.** Identificação de proteínas por espectrometria de massas da fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica em resina dietilaminoetil-sepharose **(A)** Gel 2D, em SDS-PAGE 12%, corado por Coomassie coloidal. Aproximadamente 70 µg de proteína foram utilizadas para reidratar a tira de IPG (Gradiente de pH imobilizado) de 7 cm, não-linear, pH 3–10. Dois *spots* foram excisados e enviados para análise por MS. **(B, C e D)** Estrutura terciária das proteínas (*UCSF Chimera*): região em amarelo corresponde aos epítópos lineares de células B preditos (*BepiPred*) e regiões em verde aos epítópos não preditos. PM - padrão de peso molecular (kDa).

Tabela 1. Caracterização protéica das frações obtidas por técnicas cromatográficas do extrato salino (ES) de metacestódeos de *Taenia saginata* identificadas por espectrometria de massas e sujeitos a busca no banco de dados para gênero *Taenia*.

Fração Técnica cromatográfica	Caracterização Gel 1D/2D	Proteína/ Espécie	Acesso <sup>a</sup>	kDa (experimental /teórico)	pl (experimental /teórico)	Peptídeos únicos <sup>b</sup>	Escore <sup>c</sup>	Taxa de cobertura (%)
		Enolase						
F1 (gel filtração)	1D	[ <i>Taenia multiceps</i> ]	386873714	64-68/46,4	--/7,19	7	28,52	20,32
F1 (gel filtração)	1D	Calreticulina [ <i>Taenia solium</i> ]	14029538	64-68/45,5	--/4,56	8	40,60	30,13
F2 (gel filtração)	1D	Glicoproteína de 8 kDa [ <i>Taenia multiceps</i> ]	209168646	15/9,4	--/9,31	5	44,31	43,53
F2 (gel filtração)	1D	Mioglobina [ <i>Bos Taurus</i> ]	P02192	20/17,06	--/7,08	16	12,09	72,72
DEAES2 (troca iônica)	2D	small heat shock [ <i>Taenia solium</i> ]	21665905	50-70/35,6	5,4/5,83	2	15,02	8,60
DEAES2 (troca iônica)	2D	putative growth regulator 14-3-3 [ <i>Taenia solium</i> ]	563425939	50-70/27,7	5,4/4,88	2	9,97	10,89
DEAES2 (troca iônica)	2D	Calreticulina [ <i>Taenia solium</i> ]	14029538	50-70/45,5	5,4/4,56	1	5,70	3,29

<sup>a</sup> Banco de dados de proteínas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

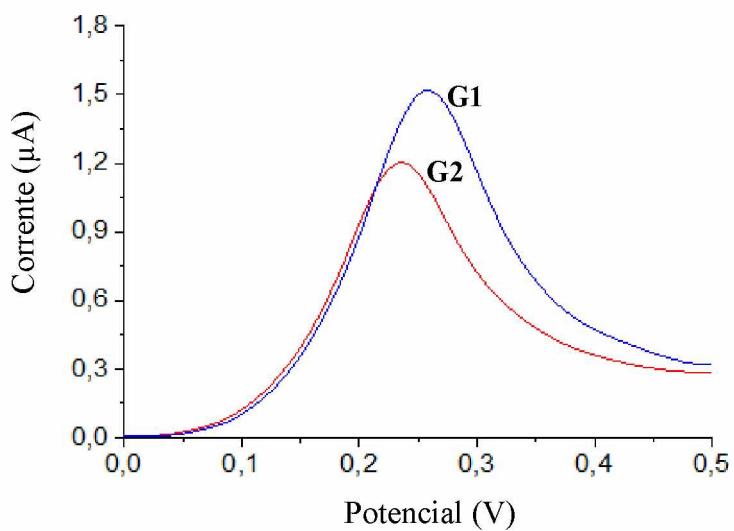
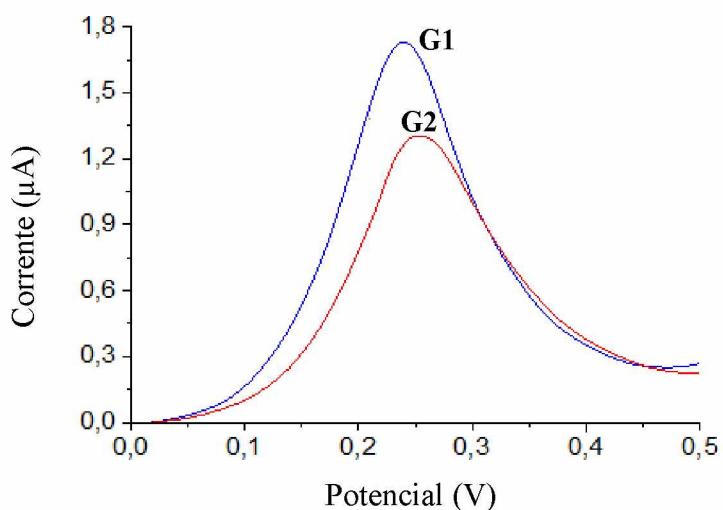
<sup>b</sup> Peptídeo único é definido como um peptídeo, independentemente de seu comprimento, o qual existe apenas em uma proteína de interesse no proteoma, mesmo que este peptídeo apareça mais de uma vez na mesma proteína (Zhao; Lin, 2010).

<sup>c</sup> As plataformas de busca atribuem valores que refletem a similaridade entre o espectro de fragmentação experimental (medido) e o espectro teórico de peptídeos da mesma proteína numa certa base de dados (Granholm; Käll, 2011).

pl – ponto isoelétrico

#### 4.4 Desenvolvimento do imunossensor

A partir dos resultados satisfatórios dos parâmetros de diagnóstico apresentados pela fração DEAES2, foi iniciado o desenvolvimento de um imunossensor utilizando a fração antigênica como sonda (**Figura 15**). Duas condições foram testadas: compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $ZnO:Ag_2O$ ) 9% (**Figura 15A**) e compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $ZnO:Ag_2O$ ) 0,9% (**Figura 15B**). Os primeiros ensaios realizados, até a redação da tese, foram com *pool* de amostras de líquor de pacientes com NC (G1) e indivíduos com outras desordens neurológicas (G2). Os resultados de voltametria de pulso diferencial revelaram picos de intensidade de corrente elétrica de  $1,52\mu A$ , para G1 e  $1,2\mu A$ , para G2, quando enriquecidos com ( $ZnO:Ag_2O$ ) 9% (**Figura 15A**). Em contrapartida, resultados apontam picos de intensidades de corrente elétrica de  $1,74\mu A$  (G1) e  $1,30\mu A$  (G2) ( $ZnO:Ag_2O$ ) 0,9% (**Figura 15B**).

**A****B**

**Figura 15.** Voltametria de pulso diferencial (DPV) obtidos em eletrodos tipo *screen-printed* de grafite (C110) immobilizado com a fração DEAES2 obtida por cromatografia de troca iônica na presença de *pool* de amostras de líquor de: **(G1)** pacientes com neurocisticercose (10 amostras) e **(G2)** pacientes com outras desordens neurológicas (10 amostras). 4-DMAA usado como indicador eletroquímico na presença de **(A)** compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $\text{ZnO:Ag}_2\text{O}$ ) 9% e **(B)** compósitos de óxido de zinco e óxido de prata ( $\text{ZnO:Ag}_2\text{O}$ ) 0,9%.

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de ensaios altamente específicos e sensíveis para detectar a presença de anticorpos anti-*Taenia* são importantes para aperfeiçoar o diagnóstico da NC humana. Desta forma, estudos têm sido realizados para obter outras fontes de alvos antigênicos:抗ígenos heterólogos e fracionados. Pesquisas estão em busca de fontes alternativas de抗ígenos para o imunodiagnóstico da NC, pois, em muitos países, é difícil encontrar suínos infectados naturalmente com *T. solium*, para obtenção de formas metacestóideas (ARRUDA et al., 2005).

Os extratos de抗ígenos heterólogos de *T. saginata* se mostraram úteis no imunodiagnóstico da NC, devido à reatividade cruzada de anticorpos, confirmando a presença de determinantes antigênicos comuns (ESPÍNDOLA et al., 2005). Os metacestódeos de *T. saginata* podem ser obtidos em quantidades consideráveis, devido ao fato da dieta habitual em vários países ser baseada no consumo de carne bovina (MORAKOTE et al., 1992; OLIVEIRA et al. 2007; 2009).

Testes imunológicos são considerados métodos importantes para confirmar os dados clínicos e para auxiliar no diagnóstico, quando as manifestações clínicas não são específicas, como acontece em doenças polimorfas, caso da NC humana. Os ensaios ELISA e immunoblotting são ferramentas importantes que possibilitam o processamento simultâneo de várias amostras, reduzindo o custo da análise. Entretanto抗ígenos apropriados, fáceis de serem produzidos e com altos parâmetros diagnósticos são necessários (ZIMIC et al., 2009).

A reatividade cruzada com o uso抗ígenos totais é um dos maiores desafios para os testes diagnósticos. Uma simples técnica de fracionamento permite o aumento da

especificidade (GONÇALVES et al., 2010; NUNES et al., 2010; 2013), mantendo a complexidade antigênica que proporciona um diagnóstico acurado. Este estudo utilizou técnicas cromatográficas facilmente executáveis, resultando na obtenção de frações antigênicas com proteínas de potencial diagnóstico na NC humana.

Vários estudos têm demonstrado a utilidade do fracionamento parcial para obtenção de frações antigênicas para aplicação no diagnóstico da cisticercose, utilizando técnicas cromatográficas (NUNES et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014; NATIVEL et al., 2016). Assana e colaboradores (2007) utilizaram uma fração proteica de metacestódeos de *T. solium* no diagnóstico da cisticercose suína, com peso molecular de 14 kDa, e que foi obtida a partir do líquido vesicular de metacestódeos de *T. solium* após duas etapas cromatográficas: primeira com gel filtração (Sephacryl S-300) e segunda com troca iônica (coluna aniónica; Mono Q HR 5/5) em cromatografia líquida de alta performance. Nativel e colaboradores (2016) identificaram nove proteínas do líquido de vesícula de metacestódeos de *T. solium*, promissoras para o diagnóstico da cisticercose suína. As proteínas foram analisadas por MS, após fracionamento simples por cromatografia de troca iônica/aniônica e caracterização em SDS-PAGE 2D.

As técnicas cromatográficas possibilitam a obtenção de antígenos fracionados que estão diretamente ligados com a diminuição de reatividade cruzada, aumentando a especificidade nos testes imunológicos (CHENTHAMARAKSHA; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001). As principais vantagens da utilização de técnicas cromatográficas são o baixo custo, a extração simples e a alta eficiência. No presente foram utilizadas duas técnicas cromatográficas para seleção de antígenos com potencial aplicação no imunodiagnóstico da NC humana, onde foi possível por meio de uma etapa adquirir as frações F1 e F2 – obtidas

por cromatografia de gel filtração e a fração DEAES2 – obtida por cromatografia de troca iônica.

Avanços recentes em espectrometria de massas e análise proteômica têm mostrado resultados promissores para a área de diagnóstico de infecções parasitárias uma vez que estas ferramentas são úteis na identificação e caracterização antigênica, possibilitando o futuro desenvolvimento de testes diagnósticos (VASOO; PRITT, 2013; NATIVEL et al., 2016).

No presente estudo foram identificadas cinco proteínas das frações antigênicas caracterizadas por eletroforese e em teste para detecção de IgG. A predição de epítópos de células B foi realizada na estrutura tridimensional das proteínas identificadas, e as regiões expostas destas moléculas são possíveis alvos para detecção de anticorpos.

A fração F1 revelou componentes antigênicos com 64-68 kDa, reativos no *immunoblotting* 1D com amostras de soro, e as proteínas enolase [*T. multiceps*] e calreticulina [*T. solium*], foram identificadas. Shiguekawa e colaboradores (2000) relataram que as bandas 47, 52, 64-68 kDa foram imunodominantes quando amostras de soro de pacientes com NC foram testadas no *immunoblotting*, utilizando extrato salino de metacestódeos de *T. solium*, mas a identificação desses polipeptídeos ainda não havia sido realizada.

A proteína enolase é uma enzima que atua na via glicolítica, catalisando a desidratação reversível do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Atua na superfície de vários patógenos como receptor de plasminogênio (RAMAJO-HERNÁNDEZ et al., 2007; CAYIR et al., 2014). A enolase é considerada também um potencial alvo vacinal, por induzir a imunidade protetora no hospedeiro, dessa forma está sendo avaliada em estudos com outros helmintos (YANG et al., 2010; CHEN et al., 2012). Considerando as sequências depositadas em banco de dados, proteínas da mesma família foram descritas em quatro

espécies do gênero *Taenia*: *T. asiatica*, *T. multiceps*, *T. pisiformis* e *T. solium*. Avaliando as estruturas conservadas da proteína enolase no gênero *Taenia*, o alinhamento da enolase de *T. saginata* obteve maior *score* com a sequência da enolase de *T. multiceps*.

A proteômica pode ser aplicada para identificar proteínas envolvidas na relação parasito-hospedeiro, especialmente, nos momentos iniciais da infecção. Santivañez e colaboradores (2010) realizaram um estudo, onde identificaram proteínas da oncosfera de metacestódeos de *T. solium*, utilizando cromatografia líquida e espectrometria de massa *in tandem* (LC-MS/MS). Um conjunto de proteínas envolvidas na adesão, enovelamento, desintoxicação e proteólise foram identificadas. Dentre essas proteínas, foram identificadas a enolase e a proteína (14-3-3), a qual foi caracterizada após o teste *immunoblotting*. No presente estudo proteínas das mesmas famílias foram identificadas nas bandas/*spots* reconhecidas por IgG nas frações F1 e DEAE S2, respectivamente.

Proteínas do citoesqueleto de metacestódeos de *T. crassiceps* (cepa ORF), como a proteína enolase [*T. asiatica*], foram caracterizadas e identificadas por SDS-PAGE 2D e LC-MS/MS (REYNOSO-DUCOING et al., 2014). Dentre suas funções, outros autores sugerem o envolvimento no apoio à dinâmica e plasticidade do citoesqueleto do parasito, com base na sua interação com microtúbulos e tubulina (KELLER et al., 2007).

A calreticulina é uma proteína multifuncional altamente conservada encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático de células eucarióticas ou está envolvida no homeostase intracelular de íons de cálcio ( $Ca^{2+}$ ), regulando diversas funções celulares, como secreção, contração-relaxamento, adesão, síntese proteica, diferenciação, organogênese e expressão gênica. Esta proteína atua no desenvolvimento de *T. solium*, especialmente durante a embriogênese (MENDLOVIC et al., 2004). No presente estudo a proteína enolase foi alinhada com outras da mesma família, utilizando as frações F1 e

DEAES2, pela primeira vez em antígeno heterólogo (*T. saginata*), evidenciando o reconhecimento dela por anticorpos IgG. Calreticulina recombinante de *T. solium* (rTsCRT) demonstrou induzir resposta imune *com perfil Th2, com produção* de IL-10 em órgãos linfoides e hamsters (MENDLOVIC et al., 2015).

A caracterização da fração F2 em SDS-PAGE 1D revelou duas bandas com diferentes pesos moleculares: F2a-20 kDa e F2b-15 kDa, após análise por MS as seguintes proteínas foram identificadas: mioglobina [*Bos taurus*] (F2a) e glicoproteína de 8 kDa [*T. multiceps*] (F2b). Uma das características da relação parasito-hospedeiro é a captação de proteínas pelo parasito. As proteínas hospedeiras constituem pelo menos 11% do teor de proteínas do fluido vesicular em metacestódeos de *T. solium*. Isto sugere que a absorção de proteínas pelo parasito acontece por meio de um mecanismo inespecífico, como pinocitose (NAVARRETE-PEREA et al., 2014).

Os mecanismos associados às preferências tissulares da fase larval do parasito não são bem compreendidos, dessa forma é necessária a pesquisa de proteínas específicas do tecido do hospedeiro. Navarrete-Perea e colaboradores (2017) analisaram preparados/antígenos de metacestódeos de *T. solium* de suínos, em SDS-PAGE 2D, localizados no sistema muscular ou no sistema nervoso central, e a proteína paramiosina foi identificada somente nos metacestódeos alojados em músculos. Os mapas proteicos da forma larval do parasito em tecidos diferentes no mesmo suíno foram similares, em contrapartida existe diferença entre proteínas da forma larval em animais diferentes. Com o intuito de auxiliar no diagnóstico imunológico tecido-específico da NC, a proteína mioglobina da forma mestacestódea de *T. saginata* foi identificada na fração F2 - obtida por cromatografia de gel filtração.

Antígenos de baixo peso molecular (8 – 50 kDa) e de excreção/secreção de metacestódeos de *T. solium* têm demonstrado potencial aplicabilidade em ensaios ELISA devido à alta especificidade (FERRER et al., 2007). A glicoproteína de 8 kDa [*T. multiceps*] foi identificada no presente estudo na fração F2 com alto desempenho diagnóstico (Se: 80%; Es: 90,5% e AUC: 0,954) . Muitas células possuem açúcares ligados covalentemente às proteínas de membrana e aos lipídios da bicamada lipídica da membrana plasmática, originando as glicoproteínas e os glicolipídios, respectivamente. As glicoproteínas e os glicolipídios auxiliam na proteção celular, no movimento de células móveis e exercem o importante papel de reconhecimento e adesão celular (DOOLITTLE, 1985).

Glicoproteínas de 8 kDa de *T. solium*, demonstraram 100% de sensibilidade e 100% de especificidade em amostras de soro no teste ELISA para NC (HANCOCK et al., 2003). As proteínas de 8 kDa foram identificadas como proteínas de diagnóstico encontradas nas bandas com pesos moleculares experimentais de 14, 18 e 21 kDa da fração ligada à lectina de lentilha de metacestódeos de *T. solium* solubilizados em ureia (GREENE; WILKINS; TSANG, 1999). Dados de sequenciamento de proteínas mostraram que as bandas 24 e 39-42 kDa contêm glicoproteínas de 8 kDa (PLANCARTE et al., 1999).

Carboidratos constituintes das glicoproteínas de metacestódeos de *T. solium* com afinidade por lectina foram revelados no teste *immunoblotting*, com reconhecimento das bandas de 28,9 kDa (GP50) e das bandas de 14, 18 e 24 kDa (glicoproteína de 8kDa) (RESTREPO et al., 2000). No presente estudo a glicoproteína de 8 kDa foi identificada na fração F2 em banda com peso molecular aparente de 15 kDa. Apenas uma amostra de soro (*H. nana*; n=1/1,8%) do G2 (n=55) apresentou reatividade cruzada com F2, no testes ELISA, evidenciando a alta especificidade dessa fração no diagnóstico da NC humana.

Em estudo anterior, Nunes e colaboradores (2013) obtiveram a fração DEAES2, caracterizada em SDS-PAGE 1D, que apresentou elevados parâmetros em testes diagnósticos, entretanto estas proteínas ainda não haviam sido identificadas. Considerando seu potencial e desempenho no teste ELISA em amostras pareadas de soro e líquor, neste estudo DEAES2 foi resolvida em SDS-PAGE 2D. Apenas dois *spots* foram reativos no *immunoblotting* 2D com amostras de líquor e as seguintes proteínas: *small heat shock* [*T. solium*]; *putative growth regulator 14-3-3* [*T. solium*] e calreticulina [*T. solium*], foram identificadas por MS.

A proteína *small heat shock*, da família das *heat shock protein* (HSPs) exerce função de molecular, facilitando o dobramento das proteínas e impedindo a agregação. As HSPs intracelulares possuem funções protetoras que permitem a sobrevivência das células em condições desfavoráveis. As HSPs extracelulares ou ligadas à membrana podem também funcionar como moduladores imunológicos nas respostas imunes inatas ou adaptativas (SCHMITT et al., 2007).

HSPs foram identificadas em formas metacestódeas de *T. solium*, sugerindo o uso dessas proteínas no diagnóstico da NC (VARGAS; SOLÍS; LACLETTE, 2001; FERRER et al., 2005). As amostras de soros de humanos e suíños com cisticercose reagiram contra a HSP de 35,6 kDa, utilizando o extrato bruto de *T. solium* (FERRER et al., 2005). Diaz-Masmela e colaboradores (2013) identificaram por LC-MS/MS, sete proteínas de metacestódeos de *T. solium*, como antígenos para o diagnóstico da cisticercose suína, entre elas, duas da mesma família encontradas na fração DEAES2: *small heat shock* e *putative growth regulator 14-3-3*. Nenhuma das proteínas apresentou reatividade cruzada quando testada com soro de suíños infectados com *Ascaris* sp., *Taenia hydatigenea/marginata* e *Echinococcus* sp. Assim, as proteínas identificadas na fração DEAES2 de *T. saginata* são antígenos promissores no

diagnóstico da NC, por já terem sido identificadas em *T. solium*, e pelo fato do reconhecimento de IgG em amostras pareadas de soro e líquor

A proteína *putative growth regulator 14-3-3* pertence a uma família de proteínas reguladoras envolvidas nas vias de sinalização intracelular e no controle do ciclo celular, presente na superfície de oncosfera de *T. solium* e na forma larval. Estudos apontam o reconhecimento dessa família de proteínas por soros de pacientes com NC (SANTIVAÑEZ et al., 2010; SALAZAR; LINDH, 2011). No presente estudo, utilizando a fração DEAES2, a taxa de positividade no G2 foi de 16,7% em amostras de soro e 10% em amostras de líquor. Considerando a baixa reatividade cruzada, esse antígeno poderia ser um candidato para diferenciar NC de outras desordens neurológicas.

O controle da NC é um importante e desafiador problema em saúde pública, a falta de testes imunológicos rápidos, simples, sensíveis e específicos ainda é um obstáculo na prática de controle da doença. Dessa forma o desenvolvimento de imunossensores no diagnóstico da NC é uma alternativa promissora, e até o presente momento não há relatos na literatura do uso dessa tecnologia no diagnóstico da NC.

Um imunossensor para o diagnóstico da esquistossomose foi desenvolvido por Deng e colaboradores (2013): um eletrodo de carbono imobilizado com proteína recombinante (SjE16), testando amostras de soro, o teste teve sensibilidade de 100%. Nesse estudo foram utilizados eletrodos de grafite (C110), imobilizados com a fração DEAES2, acrescido do indicador (4-DMAA) e enriquecido com compósitos de ZnO com Ag<sub>2</sub>O (ZnO:Ag<sub>2</sub>O), 0,9 ou 9%, para validação em amostras de líquor.

O DMAA incorporado ao eletrodo antes do líquor impede a interferência na sensibilidade e especificidade. As nanopartículas possibilitam a transferência de elétrons entre as biomoléculas e a superfície dos eletrodos, no presente estudo testamos

nanopartículas em duas condições, compósitos ZnO:Ag<sub>2</sub>O 0,9% apontaram melhor desempenho sensorial (1,52 µA, para G1 e 1,2 µA, para G2).

As vantagens do imunossensor devem-se ao pouco volume de amostras utilizadas (2 µL do extrato antigênico e 2 µL de amostras de líquor- diluição 1/100), o eletrodo pode ser reutilizado e a rapidez no resultado em relação aos testes imunológicos. Os ensaios preliminares, realizados nesse estudo, apresentaram resultados promissores, porém foram utilizados *pool* de amostras de líquor, assim futuramente são necessários testes com amostras individuais de líquor e/ou soro.

Utilizando técnicas cromatográficas simples e de fácil execução, obtivemos frações antigênicas sensíveis e específicas para aplicação em plataformas imunodiagnósticas. As proteínas que foram identificadas são compostas por peptídeos imunodominantes, assim peptídeos sintetizados a partir desses alvos poderão ser aplicados em kits de diagnóstico, além de serem candidatos promissores para desenvolvimento de vacinas.

## 6. CONCLUSÃO

As frações antigênicas F1 e F2, obtidas por cromatografia de gel filtração, e a fração DEAES2, obtida por cromatografia de troca iônica, a partir do extrato salino de metacestódeos de *T. saginata* são fontes de antígenos sensíveis e específicos para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em plataformas diagnósticas na NC humana.

Proteínas imunodominantes (enolase; calreticulina; glicoproteína de 8 kDa; *small heat shock; putative growth regulator 14-3-3*) e a proteína do hospedeiro mioglobina [*Bos taurus*] foram identificadas a partir das frações obtidas. A partir das proteínas identificadas e da predição de epítópos de célula B, será possível a síntese de peptídeos para utilização como candidatos vacinais e, especialmente ao diagnóstico na NC, além de estudos da relação parasito-hospedeiro.

Um imunossensor foi desenvolvido a partir da fração DEAES2, que requer pouco volume de amostra biológica; é portátil; apresenta elevada sensibilidade e especificidade; o teste é realizado em pouco tempo, demonstrando assim uma nova ferramenta com potencial aplicação no diagnóstico rápido da NC humana.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.61, p.822-828, 2003.
- ALARCÓN, F. Neurocisticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. **Revista de Neurología**, v. 43, p. S93-S100, 2006.
- ANTONIUK, S. Epidemiología de la neurocisticercosis. **Revista de Neurología**, v.29, p.331-333, 1999.
- ARRIOLA, C. S.; GONZALEZ, A. E.; GOMEZ-PUERTA, L. A.; LOPEZ-URBINA, M. T.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H. New insights in cysticercosis transmission. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. e3247, 2014.
- ARRUDA, G. C.; DA SILVA, A. D. T.; QUAGLIATO, E. M. A. B.; MARETTI, M. A.; ROSSI, C. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 10, p. 1005-1012, 2005.
- ASSANA, E.; KANOBANA, K.; TUME, C. B.; ZOLI, P. A.; NGUEKAM, J. P.; GEERTS, S.; BERKVENS, D.; DORNY, P. Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 370-376, 2007.
- BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffinding von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p.41-47, 1917.
- BALVEDI, R. P.; CASTRO, A. C.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a specific biomarker for Epstein-barr virus using a polymer-based genosensor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 9051-9066, 2014.
- BARBOSA, A. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; SILVA, S. A.; CAMPOS, D. M. B. Cisticercose: fatores relacionados à interação parasito-hospedeiro, diagnóstico e soroprevalência. **Revista de Patologia Tropical**, v.29, p.17-29, 2000.
- BENEDETTI, M. R.; FALAVIGNA, D. L. M.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. L. Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com neurocisticercose atendidos no hospital universitário regional de Maringá, Paraná, Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.65, p.124-129, 2007.
- BOBES, R. J.; FRAGOSO, G.; FLEURY, A.; GARCIA-VARELA, M.; SCIUTTO, E.; LARRALDE, C.; LACLETTE, J. P. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 23, p. 150-160, 2014.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- 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

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

a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and Immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.44, p.7-12, 2002.

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

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

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

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

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

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

CARPIO, A.; ROMO, M. L. Multifactorial basis of epilepsy in patients with neurocysticercosis. **Epilepsia**, v. 56, p. 973-974, 2015.

CARPIO, A.; ROMO, M. L. State of the art in neurocysticercosis: Imaging and epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 821–822, 2016.

CAYIR, E.; ERDEMIR, A.; OZKAN, E.; TOPUZOGLUARI, M.; BOLAT, Z. B.; AKAT, A.; TURGUT-BALIK, D. Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from *Theileria annulata*. **Molecular Biotechnology**, v. 56, p. 689–696, 2014.

CHEN, N.; YUAN, Z. G.; XU, M. J.; ZHOU, D. H.; ZHANG, X. X.; ZHANG, Y. Z.; WANG, X. W.; YAN, C.; LIN, R. Q.; ZHU, X. Q. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. **Vaccine**, v, 30, p. 3478–3482, 2012.

CHENTHAMARAKSHAN, V.; VADIVELU, J.; PUTHUCHEARY, S. D. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.39, p. 1-7, 2001.

CORAL-ALMEIDA, M.; GABRIËL, S.; ABATIH, E. N.; PRAET, N.; BENITEZ, W.; DORNY, P. *Taenia solium* human cysticercosis: A systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, e.0003919, 2015.

COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigenicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano. **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, p. 337–341, 1982.

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

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

DA SILVA, G. B.; NUNES, D. S.; DE SOUSA, J. E.; GONÇALVES-PIRES, M. D.; LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Antigenic fractions from *Taenia crassiceps* metacestodes obtained by hydrophobicity for the immunodiagnosis of active and inactive forms of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid samples. **Parasitology International**, v. 66, p. 134-138, 2017.

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

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: a review. **The Scientific World Journal**, 2012, p. 159821 (1-8), 2012a.

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

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

DEL BRUTTO, O. H.; LAMA, J.; ZAMBRANO, M.; DEL BRUTTO, V. J. Neurocysticercosis is a neglected microbleed mimic. A cautionary note for stroke neurologists. **European Neurology**, v.72, p.306-308, 2014.

DEL BRUTTO, O. H.; NASH, T.E.; WHITE, A. C. Jr.; RAJSHEKHAR, V.; WILKINS, P. P.; SINGH, G.; VASQUEZ, C. M.; SALGADO, P.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 372, p. 202–210, 2017.

DENG, W.; XU, B.; HU, H.; LI, J.; HU, W.; SONG, S.; FENG, Z.; FAN, C. Diagnosis of schistosomiasis japonica with interfacial co-assembly-based multi-channel electrochemical immunosensor arrays. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1789 (1-6), 2013.

DESHMUKH, P.; SONI, P. K.; KANKORIYA, A.; HALVE, A. K.; DIXIT, R. 4-aminoantipyrine: A significant tool for the synthesis of biologically active schiff bases and metal complexes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 34, p. 162-170, 2015.

DEVLEESSCHAUWER, B.; ALLEPUZ, A.; DERMAUW, V.; JOHANSEN, M. V.; LARANJO-GONZÁLEZ, M.; SMIT, G. S.; SOTIRAKI, S.; TREVISAN, C.; WARDROP, N. A.; DORNY, P.; GABRIËL, S. *Taenia solium* in Europe: Still endemic? **Acta Tropica**, v. 165, p. 96-99, 2017.

DIAZ-MASMELA, Y.; FRAGOSO, G.; AMBROSIO, J. R.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; ROSAS, G.; ESTRADA, K.; CARRERO, J. C.; SCIUTTO, E.; LACLETTE, J. P.; BOBES, R. J. Immunodiagnosis of porcine

cysticercosis: identification of candidate antigens through immunoproteomics. **The Veterinary Journal**, v. 198, p. 656–660, 2013.

DING, L.; BOND, A. M.; ZHAI, J.; ZHANG, J. Utilization of nanoparticle labels for signal amplification in ultrasensitive electrochemical affinity biosensors: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 797, p. 1-12, 2013.

DONG, W. H.; WANG, T.Y.; WANG, F.; ZHANG, J. H. Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue. **PLoS One**, v. 6, p. e22394, 2011.

DOOLITTLE, R. F. Proteins. **Scientific American**, v. 253, p. 88-99, 1985.

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

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

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

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

FERRER, E.; CORTÉZ, M. M.; CABRERA, Z.; ROJAS, G.; DÁVILA, I.; ALARCÓN DE NOYA, B.; PÉREZ, H. A.; FERNANDEZ, I.; ROMERO, H. U.; HARRISON, L. J.; PARKHOUSE, R. M.; GÁRATE, T. Oncospheral peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 568-576, 2005.

FERRER, E.; BONAY, O.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZÁLEZ, L. M.; D'AVILA, I.; CORTÉZ, M. M.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; GÁRATE, T. Molecular cloning and characterization of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 90-100, 2007.

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

FLEURY, A.; SASTRE, P.; SCIUTTO, E.; CORREIA, S.; MONEDERO, A.; TOLEDO, A.; HERNANDEZ, M.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E. A Lateral Flow Assay (LFA) for the rapid detection of extraparenchymal neurocysticercosis using cerebrospinal fluid. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 67–70, 2016.

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

- FLISSER, A.; RODRÍGUEZ-CANUL, R.; WILLINGHAM III, A. L. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 283-292, 2006.
- FLISSER, A.; VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J. P. *Taenia solium*: um parasito cosmopolita. **Investigación Y Ciencia**, v.356, p.24-33, 2006.
- FOGANG, Y. F.; SAVADOGO, A. A.; CAMARA, M.; TOFFA, D. H.; BASSE, A.; SOW, A. D.; NDIAYE, M. M. Manging neurocysticercosis: challenges and solutions. **Journal of International Journal of General Medicine**, v. 8, p. 333–344, 2015.
- FORLENZA, O. V.; VIEIRA FILHO, A. G.; NÓBREGA, J. P. S.; MACHADO, L. R.; BARROS, N. G.; CAMARGO, C. H. P.; SILVA, M. F. G. Psychiatric manifestations of neurocysticercosis: a study of 38 patients from a neurology clinic in Brazil. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v.62, p.612-616, 1997.
- FRIEDMAN, R. D. Comparation of four different silver-staining techniques for salivary protein detection in alkaline polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.346-349, 1982.
- GABRIËL, S.; JOHANSEN, M.V.; POZIO, E.; SMIT, G.S.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ALLEPUZ, A.; PAPADOPOULOS, E.; VAN DER GIESSEN, J.; DORNY, P. Human migration and pig/pork import in the European Union: What are the implications for *Taenia solium* infections? **Veterinary Parasitology**, v.213, p.38-45, 2015.
- GARCIA, H. H.; DEL BRUTTO, O. H. Imaging finding in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v.87, p.71-78, 2003.
- GARCIA, H. H.; EVANS, C. A. W.; NASH, T. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; WHITE, A. C.; BOTERO, D.; RAJSHEKHAR, V.; TSANG, V. C. W.; SCHANTZ, P. M.; ALLAN, J. C.; FLISSER, A.; CORREA, D.; SARTI, E.; FRIEDLAND, J. S.; MARTINEZ, S. M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R. H.; DEL BRUTTO,O. H. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 747–756, 2002.
- GARCIA, H. H.; DEL BRUTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE-JÚNIOR, A. C.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, p.3-9, 2005.
- GARCIA, H. H; GONZALEZ, A. E; RODRIGUEZ, S; GONZALVEZ, G; LLANOS-ZAVALAGA, F; TSANG, V.C.W. GILMAN, R. H. Epidemiología y control de la cisticercosis en el Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.27, p.592-597, 2010.
- GARCÍA-VALVERDE, M. T.; LUCENA, R.; GALÁN-CANO, F.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL M. Titanium-dioxide nanotubes as sorbents in (micro) extraction techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 37-45, 2014.
- GARG, R. K.; DESAI, P.; KAR, M.; KAR, A. M. Multiple ring enhancing brain lesions on computed tomography: an Indian perspective. **Journal of the Neurological Sciences**, v.266, p.92-96, 2008.
- GILMAN, R. H.; GONZALEZ, A. E.; LLANOS-ZAVALAGA, F.; TSANG, V. C. W.; GARCIA, H. H. Prevention and control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Peru. **Pathogens and Global Health**, v. 106, p. 312–318, 2012.

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

GONZALES, I.; RIVERA, J. T.; GARCIA, H. H. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 136-146, 2016.

GRABOWSKA, I.; MALECKA, K.; JAROCKA, U.; RADECKI, J.; RADECKA, H. Electrochemical biosensors for detection of avian influenza virus--current status and future trends. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, p. 471-478, 2014.

GRANHOLM, V.; KÄLL, L. Quality assessments of peptide-spectrum matches in shotgun proteomics. **Proteomics**, v. 11, p. 1086-1093, 2011.

GREENE, R. M.; WILKINS, P. P.; TSANG, V. C. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-kDa subunits. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, p. 257-261, 1999.

GREINER, M. Two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC): a Microsoft-EXCEL template for the selection of cut-off values in diagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, p. 145-146, 1995.

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

GRIPPER, L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease—A review. **Acta Tropica**, v. 166, p. 218–224, 2017.

GUINTO, G.; GUINTO, Y. Neurocysticercosis: is medical management innocuous. **World Neurosurgery**, v. 79, p.71-72. 2013.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

HANCOCK, K.; KHAN, A.; WILLIAMS, F. B.; YUSHAK, M. L.; PATTABHI, S.; NOH, J.; TSANG, V. C. W. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2577-2586, 2003.

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

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

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

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

- HOCK, B. Antibodies for immunosensors a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 347, p. 177-186, 1997.
- ITO, A.; YANAGIDA, T.; NAKAO, M. Recent advances and perspectives in molecular epidemiology of *Taenia solium* cysticercosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 40, p. 357–367, 2016.
- IZCI, Y.; MOFTAKHAR, R; SALAMAT, M. S; BASKAYA., M. K. Spinal intramedullary cysticercosis of the conus medullaris. **WMJ:official publication of the State Medical Society of Wisconsin**, v.107, p.34-39, 2008.
- JAESCHKE, R.; GUYATT, G.H.; SACKET, D. L. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **JAMA**, v. 271, p. 703-707, 1994.
- JAY, A.; DHANDA, J.; CHIODINI, P. L.; WOODROW, C. J.; FARTHING, P. M.; EVANS, J.; JAGER, H. R. Oral cysticercosis. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.45, p.331-334, 2007.
- JAYASHI, C. M.; GONZALEZ, A. E.; CASTILLO-NEYRA, R.; KYNGDON, C. T.; GAUCI, C. G.; LIGHTOWLERS, M.W. Characterization of antibody responses in pigs induced by recombinant oncosphere antigens from *Taenia solium*. **Vaccine**, v. 30, p. 7475–7480, 2012.
- KELLER, A.; PELTZER, J.; CARPENTIER, G.; HORVÁTH, I.; OLÁH, J.; DUCHESNAY, A.; OROSZ, F.; OVÁDI, J. Interactions of enolase isoforms with tubulin and microtubules during myogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 919–926, 2007.
- KOBAYASHI, K.; NAKAMURA-UCHIYAMA, F.; NISHIGUCHI, T.; ISODA, K.; KOKUBO, Y.; ANDO, K.; KATURAHARA, M.; SAKO, Y.; YANAGIDA, T.; ITO, A.; IWABUCHI, S.; OHNISHI, K. Rare case of disseminated cysticercosis and taeniasis in a Japanese traveler after returning from India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 58–62, 2013.
- KRAFT, R. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. **American Family Physician**, v. 76, p. 91-96, 2007.
- KUNGU, J. M.; DIONE, M. M.; EJOBI, F.; OCAIDO, M.; GRACE, D. Risk factors, perceptions and practices associated with *Taenia solium* cysticercosis and its control in the smallholder pig production systems in Uganda: a cross-sectional survey. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1-9 , 2017.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LARRALDE, C.; LACLETTE, J. P.; OWEN, C. S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALIL, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M. L.; GOVEZENSKY, T.; MONTOYA, R. M.; GOODSAID, F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p. 965-973, 1986.
- LEE, E. G.; BAE, Y. A.; JEONG, Y. T.; CHUNG, J. Y.; JE, E. Y.; KIM, S. H.; NA, B. K.; JU, J. W.; KIM, T. S.; MA, L.; CHO, S. Y.; KONG Y. Proteomic analysis of a 120 kDa protein complex in cyst fluid of *Taenia solium* metacestode and preliminary evaluation of its value for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 131, p.867-879, 2005.

- LI, Y.; SCHLUESENER, H. J.; XU, S. Gold nanoparticle-based biosensors. **Gold Bulletin**, v. 43, p. 29-41, 2010.
- LIU, G.; LIN, Y. Nanomaterial labels in electrochemical immunosensors and immunoassays. **Talanta**, v. 74, p. 308-317, 2007.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.29, p.265-275, 1951.
- LUTZ, A. *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.11, p.121-155, 1919.
- MACHADO, G. A.; SANTIAGO, F. M.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.12, p.1369-1376, 2007.
- MACHADO, G. A.; OLIVEIRA, H. B.; GENNARI-CARDOSO, M. L.; MINEO, J. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Serodiagnosis of human neurocysticercosis using antigenic components of *Taenia solium* metacestodes derived from the unbound fraction from jacalin affinity chromatography. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 368-375, 2013.
- MAHANTY, S.; GARCIA, H. H. Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 91, p. 172–184, 2010.
- MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Caderno de Saúde Coletiva**, v. 11, p. 7-31, 2003.
- MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N, Jr.; CAVALCANTI, M. G.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Reprint of "Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000-2011: Epidemiology of a neglected neurologic cause of death". **Acta tropica**, v. 165 p. 170-178, 2017.
- MENDES, E. C.; SILVA, S. S.; FONSECA, E. A.; SOUZA, H. R.; CARVALHO, R. W. Human neurocysticercosis in Baixada Fluminense, Rio de Janeiro State, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v.63, p.1058-1062, 2005.
- MENDLOVIC, F.; OSTOA-SALOMA, P.; SOLÍS, C. F.; MARTÍNEZ-OCAÑA, J.; FLISSER, A.; LACLETTE, J. P. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. **Journal of Parasitology**, v. 90, p. 891–893, 2004.
- MENDLOVIC, F.; GARZA-RODRÍGUEZ, A.; CARRILLO-FARGA, J.; GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, F.; MARAVILLA, P.; FLISSER, A. From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. **Parasites & Vectors**, v.16, p.7-12, 2014.
- MENDLOVIC, F.; CRUZ-RIVERA, M.; ÁVILA, G.; VAUGHAN, G.; FLISSER, A. Cytokine, antibody and proliferative cellular responses elicited by *Taenia solium* calreticulin upon experimental infection in hamsters. **PLoS One**, v. 10, p. e0121321, 2015.
- MICHELET, L.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E.; KENDJO, E.; FRAGOSO, G.; PARIS, L.; BOUTEILLE, B. Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. **Journal Clinical Microbiology**, v.49, p.195-200, 2011.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G. TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I. Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação. Uberlândia, EDUFU, 273p., 2005.

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

MORAKOTE, N.; NAWACHAROEN, W.; SUKONTHASUN, K.; THAMMASONTI, W.; KHAMBOONRUANG, C. Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. **Southeast Asian Ministers of Education Council Central Coordinating Board for Tropical Medicine and Public Health**, v. 23, p. 77–81, 1992.

MOYANO, L. M., O'NEAL, S. E., AYVAR, V., GONZALVEZ, G., GAMBOA, R., VILCHEZ, P., RODRIGUEZ, S., REISTETTER, J., TSANG, V. C., GILMAN, R. H., GONZALEZ, A. E., GARCIA, H. H. High prevalence of asymptomatic neurocysticercosis in an endemic rural community in Peru. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, p. e0005, 2016.

NAKAO, M.; LAVIKAINEN, A.; YANAGIDA, T.; ITO, A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). **International Journal for Parasitology**, v. 43, p. 1017–1029, 2013.

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

NATIVEL, P.; RAHANTAMALALA, A.; RAMIANDRISOA, S.; RASOAMAMPIANINAA, V.; DUCHATEAU, M.; CHAMOT-ROOKE, J.; GUEBEY, R.; RASAMOELINA-ANDRIAMANIVO, H.; JAMBOU, R. Bio-guided identification of proteins for the diagnosis of cysticercosis in swine. **Veterinary Parasitology**, v. 15, p. 220-223, 2016.

NAVARRETE-PEREAA, J.; MOGUEL, B.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO E.; BOBES, R. J.; LACLETTE, J. P. Identification and quantification of host proteins in the vesicular fluid of porcine *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 11-17, 2014.

NAVARRETE-PEREAA, J.; MOGUEL, B.; BOBES, R. J.; VILLALOBOS, N.; CARRERO, J. C.; SCIUTTO, E.; SOBERÓN, X.; LACLETTE, J. P. Protein profiles of *Taenia solium* cysts obtained from skeletal muscles and the central nervous system of pigs: Search for tissue-specific proteins. **Experimental Parasitology**, v. 172, p. 23-29, 2017.

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

NUNES, D. S; RIBEIRO, V. S; MANHANI, M. N; COSTA-CRUZ, J. M. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 258-264, 2010.

NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; DA CUNHA, J. P. Jr; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.76, p.36-41, 2013.

NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; DA CUNHA, J. P. Jr; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of gel filtration fraction as potential biomarker for neurocysticercosis in serum: towards a new diagnostic tool. **Parasitology**, v. 17, p. 1-10, 2016.

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

O'KEEFE, K. A.; EBERHARD, M. L.; SHAFIR, S. C.; WILKINS, P.; ASH, L. R.; SORVILLO, F. J. Cysticercosis-related hospitalizations in the United States, 1998-2011. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, p. 354-359, 2015.

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

OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; CABRAL, D. D.; COSTA-CRUZ, J. M. Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. **Parasitology Research**, v.101, p.1007-1113, 2007.

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

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

OSIPYONOK, N. M.; SINGAEVSKY, A. F.; NOSKOV, YU. V.; PIRYATINSKI, YU. P.; SMERTENKO, P.S.; DIMITRIEV, O.P.; PUD, A. A Doping of CdS nanoparticles. **Materials Science and Engineering: B**, v. 147, p. 254-257, 2008.

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

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

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

PERALTA, R. H.; ESPÍNDOLA, N. M.; PARDINI, A. X.; IHA, A. H.; MOURA, H.; BARR, J. R.; VAZ, A. J.; PERALTA, J. M. *Taenia crassiceps* cysticerci: characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 295-300, 2010.

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

- PLANCARTE, A.; HIROTA, C.; MARTÍNEZ-OCAÑA, J.; MENDOZA-HERNÁNDEZ, G.; ZENTENO, E.; FLISSER A. Characterization of GP39–42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. **Parasitology Research**, v. 85, p. 680–684, 1999.
- PRABHAKARAN, V.; RAJSHEKHAR, V.; MURRELL, K. D.; OOMMEN, A. *Taenia solium* metacestodes glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, p.478-484, 2004.
- PRABHAKARAN, V.; RAGHAVA, M. V.; RAJSHEKHAR, V.; MULIVIL, J.; OOMMEN, A. Seroprevalence of *Taenia solium* antibodies in Vellore district, south India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, p.246-250, 2008.
- PRAKASH, S.; CHAKRABARTY, T.; SINGH, A. K.; SHAHI, V. K. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 43-53, 2013.
- PRASAD, K. N.; PRASAD, A.; VERMA, A.; SINGH, A. K. Human cysticercosis and Indian scenario: a review. **Journal of Biosciences**, v.33, p.571-582, 2008.
- PRETELL, E. J.; MARTINOT, C. J.; GARCIA, H. H.; ALVARADO, M.; BUSTOS, J. A.; MARTINO, T. C. Differential diagnosis between cerebral tuberculosis and neurocysticercosis by magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Computer Assisted Tomography**, v.29, p.112-114, 2005.
- PUSHKER, N.; BAJAJ, M. S.; BALASUBRAMANYA, R. Disseminated cysticercosis involving orbit, brain and subcutaneous tissue. **Journal of Infection**, v.51, p.245-248, 2005.
- RAMAJO-HERNÁNDEZ, A.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; RAMAJO-MARTÍN, V.; OLEAGA, A. *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 83–91, 2007.
- RAMOS-ZÚÑIGA, R.; PÉREZ-GÓMEZ, H. R.; JÁUREGUI-HUERTA, F.; LÓPEZHERNÁNDEZ, M. D.; VALERA-LIZÁRRAGA, J. E.; PAZ-VÉLEZ, G.; BECERRA-VALDIVIA, A. Incidental consequences of antihelmintic treatment in the central nervous system. **World Neurosurgery**, v.79, p. 149-153, 2013.
- RESTREPO, B. I.; OBREGÓN-HENAO, A.; MESA, M.; GIL, D. L.; ORTIZ, B. L.; MEJÍA, J. S.; VILLOTA, G. E.; SANZÓN, F.; TEALE, J. M. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestodes glycoprotein antigens. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 689-696, 2000.
- REVERTÉ, L.; PRIETO-SIMÓN, B.; CAMPÀS, M. New advances in electrochemical biosensors for the detection of toxins: Nanomaterials, magnetic beads and microfluidics systems. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 908, p. 8-21, 2016.
- REY, L. Cisticercose humana. In: **Parasitologia e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p.510-520.
- REYNOSO-DUCOING, O.; VALVERDE-ISLAS, L.; PAREDES-SALOMON, C.; PÉREZ-REYES, A.; LANDA, A.; ROBERT, L.; MENDOZA, G.; AMBROSIO, J. R. Analysis of the expression of cytoskeletal proteins of *Taenia crassiceps* ORF strain cysticerci (Cestoda). **Parasitology Research**, v. 113, p. 1955–1969, 2014.

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

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

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

RIZVI, S. A., SALEH, A. M., FRIMPONG, H. A., MOHIY, H. M., AHMED, J., EDWARDS, R. D. AHMED, S. S. Neurocysticercosis: a case report and brief review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 100–102, 2016.

ROCHA-SANTOS, T. A. P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 28-36, 2014.

ROSSI, N.; RIVAS, I.; HERNÁNDEZ, M.; URDANETA, H. Immunodiagnosis of neurocysticercosis: comparative study of antigenic extracts from *Cysticercus cellulosae* and *Taenia crassiceps*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 52, p. 157-164, 2000.

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

SALAZAR, F.; LINDH, J. *Taenia solium*: A two-dimensional Western blotting method combined with the use of an EST-library for the identification of immunogenic proteins recognized by sera from neurocysticercosis patients. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 371–376, 2011.

SANTIVAÑEZ, S. J.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.; CHILE, N.; OLEAGA, A.; ARANA, Y.; PALMA, S.; VERASTEGUI, M.; GONZALEZ, A. E.; GILMAN, R.; GARCIA, H. H.; SILES-LUCAS, M. Proteomic study of activated *Taenia solium* oncospheres. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, p. 32-39, 2010.

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

SCHMITT, E.; GEHRMANN, M.; BRUNET, M.; MULTHOFF, G.; GARRIDO, C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: Repercussions in cancer therapy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 5–27, 2007.

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

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

SHARMA, N.; KUMA, J.; THAKUR, S.; SHARMA, S.; SHRIVASTAVA, V. Antibacterial study of silver doped zinc oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Drug Invention Today**, v. 5, p. 50-54, 2013.

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

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

SILVA, G. B.; NUNES, D. S.; SOUSA, J. E. N.; GONÇALVES-PIRES, M. R F.; LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Antigenic fractions from *Taenia crassiceps* metacestodes obtained by hydrophobicity for the immunodiagnosis of active and inactive forms of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid samples. **Parasitology International**, v. 66, p. 134-138, 2017.

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

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

SINGHI, P.; SUTHAR, R. Neurocysticercosis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 166–171, 2015.

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

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

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

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

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

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

TYMECKI, L.; KONCKI, R. Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis. **Sensor and Actuators B**, v. 113, p. 782-786, 2006.

VARGAS, P. L.; SOLÍS, C. F.; LACLETTE, J. P. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* (Cestoda). **Parasitology**, v. 122, p. 583–588, 2001.

- VASOO, S.; PRITT, B. S. Molecular diagnostics and parasitic disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 33, p. 461-503, 2013.
- VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (Eds.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996, p.177-184.
- VERMA, A.; PRASAD, K. N.; CHEEKATLA, S. S.; NYATI, K. K.; PALIWAL, V. K.; GUPTA, R. K. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. **Medicine Microbiology Immunology**, v.4, p.255-261, 2011.
- WANG, L.; KANG, Y.; LIU, X.; ZHANG, S.; HUANG, W.; WANG, S. ZnO nanorod gas sensor for ethanol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, p. 237-243, 2012.
- WHITE, A. C. Jr. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Annual Review of Medicine**, v.51, p.187-206, 2000.
- YAMASAKI, H.; NAKAO, M.; SAKO, Y.; NAKAYA, K.; SATO, M. O.; ITO, A. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. **Parasitology International**, v.55, p. S81-S85, 2006.
- YANG, J.; QIU, C.; XIA, Y.; YAO, L.; FU, Z.; YUAN, C.; FENG, X.; LIN, J. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the *schistosomulum* stage. **Parasitology Research**, v. 107, p. 667–677, 2010.
- YOUDEN, W. J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 32-35, 1950.
- ZHAO Y.; LIN, Y. H. Whole-cell protein identification using the concept of unique peptides. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 8, p. 33-41, 2010.
- ZAMMARCHI, L.; ANGHEBEN, A.; GOBBI, F.; ZAVARISE, G.; REQUENA-MENDEZ, A.; MARCHESE, V.; MONTAGNANI, C.; GALLI, L.; BISOFFI, Z.; BARTOLONI, A.; MUÑOZ, J. Profile of adult and pediatric neurocysticercosis cases observed in five Southern European centers. **Neurological Sciences**, v. 37, p. 1349-1355, 2016.
- ZIMIC, M.; PAJUELO, M.; RUEDA, D.; LÓPEZ, C.; ARANA, Y.; CASTILLO, Y.; CALDERÓN, M.; RODRIGUEZ, S.; SHEEN, P.; VINETZ, J. M.; GONZALES, A.; GARCÍA, H. H.; GILMAN, R. H. Utility of a protein fraction with cathepsin L-Like activity purified from cysticercus fluid of *Taenia solium* in the diagnosis of human cysticercosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 964–970, 2009.
- ZYMBERG, S.T. Neurocysticercosis. **World Neurosurgery**, v. 79, p. S24.e5-8, 2013.

**ANEXO**

Artigo científico referente à tese, publicado em periódico internacional.  
(*Parasitology*; fator de impacto: 3,031; JCR: 2015)

---

NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; DA CUNHA, J. P. JR; COSTA-CRUZ, J. M. Usefulness of gel filtration fraction as potential biomarker for neurocysticercosis in serum: towards a new diagnostic tool. **Parasitology**, v. 17, p. 1-10, 2016.

# Usefulness of gel filtration fraction as potential biomarker for neurocysticercosis in serum: towards a new diagnostic tool

D. S. NUNES<sup>1</sup>, H. T. GONZAGA<sup>1</sup>, V. S. RIBEIRO<sup>1,2</sup>, J. P. CUNHA-JÚNIOR<sup>1</sup> and J. M. COSTA-CRUZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará 1720, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

<sup>2</sup> Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Área de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, Av. Dr. Lamartine Pinto Avelar 1120, Bloco M, 75704-020, Catalão, GO, Brazil

(Received 14 July 2016; revised 6 September 2016; accepted 12 September 2016)

## SUMMARY

There is an increasing interest in improving neurocysticercosis (NCC) diagnosis through the search of new and alternative antigenic sources, as those obtained from heterologous antigens. The aim of this study was to obtain potential biomarkers for NCC diagnosis after gel filtration chromatography [gel filtration fraction (GFF)] from the total saline extract (SE) from *Taenia saginata* metacestodes, followed by protein identification and application in immunodiagnostic. SE and GFF proteic profiles were characterized in gel electrophoresis, and diagnostic performance was verified by testing 160 serum samples through enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. Sensitivity (Se), specificity (Sp) and other diagnostic parameters were calculated. Polypeptides of interest in the diagnosis of human NCC present at GFF were analysed by mass spectrometry (MS) and B-cell epitopes were predicted. GFF had the best diagnostic parameters: Se 93.3%; Sp 93%; AUC 0.990; LR+ = 13.42 and LR- = 0.07, and proved to be useful reacting with serum samples in immunoblotting. Proteic profile ranged from 64 to 68 kDa and enolase and calcium binding protein calreticulin precursor were identified after MS. The enolase and calcium-binding protein calreticulin precursor showed 18 and 10 predicted B-cell epitopes, respectively. In conclusion we identified important markers in the GFF with high efficiency to diagnose NCC.

Key words: gel filtration fraction, immunodiagnosis, neurocysticercosis, proteomic, *Taenia saginata*.

## INTRODUCTION

Neurocysticercosis (NCC) is a severe and specific infection, caused by the ingestion of *Taenia solium* eggs, and the consequent invasion and development of the larval stages at the central nervous system. The disease is endemic in areas with deficient sanitary conditions mainly in developing countries of America, Africa and Asia (Ndimubanzi *et al.* 2010; Del Brutto, 2012; Martins-Melo *et al.* 2016). In these endemic areas, NCC is responsible for about 30% of acquired epilepsy cases (Carpio and Romo, 2015; Del Brutto and García, 2015; Gonzales *et al.* 2016).

Southern region of the USA is seen as an endemic area, due to the border with Mexico and the consequent increased immigration from highly endemic regions. In addition, the spread of parasitic diseases can be highlighted in other countries from North America and European Union because of Latin Americans migration (Arriola *et al.* 2014; O'keefe *et al.* 2014; Gabriël *et al.* 2015; Rizvi *et al.* 2016).

\* Corresponding author: Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. Avenida Pará 1720, 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: [costacruz@ufu.br](mailto:costacruz@ufu.br)

NCC, although a life-threatening disease in severe cases, is generally an acute or long-lasting infection affecting the quality of the patient life and social environment. The disease has socioeconomic importance because majority of patients are at productive ages and frequently become unable to work soon after the onset of symptoms (Madrazo, 2013).

Diagnosis of NCC is based on clinical, epidemiological and laboratory findings, and it can also be accurately performed using neuroimaging techniques such as computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (Del Brutto *et al.* 2014). Unfortunately, these methods are expensive and usually inaccessible at the poorest endemic areas, and therefore the development of other protocols is also needed. The immunological tests most commonly used to detect antibodies against *T. solium* are the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting using cerebrospinal fluid (CSF) and/or serum (Costa *et al.* 1982; Barcelos *et al.* 2001; Husain *et al.* 2008), but these tests have problems related to the complex composition of total antigenic preparations and also with the cross-reactions with samples from patients infected with other parasitic diseases.

To overcome problems related with antigen preparation and cross-reactivity there are efforts to develop the use of fractionated heterologous

antigens, such as those derived from *Taenia saginata* metacestodes. The use of this heterologous antigen for NCC immunodiagnosis is important where the collection of *T. solium* metacestodes to prepare homologous antigen is difficult (Oliveira *et al.* 2007, 2009; Coral-Almeida *et al.* 2015). Diagnostic performance of heterologous antigens was improved resulting in higher diagnostic indexes through fractionation using other chromatographic techniques (Nunes *et al.* 2010, 2013). Moreover there is a need to use proteomic tools to identify proteins with potential applicability in NCC diagnosis.

In light of these previous reports, we developed a three stage strategy to obtain a protein biomarker as new diagnostic tool for NCC diagnosis in serum. First, we used gel filtration chromatographic technique to fractionate total saline extract (SE) from *T. saginata* metacestodes obtaining the gel filtration fraction (GFF). Subsequently, the diagnostic potential of the obtained fraction was evaluated by ELISA and immunoblotting. Finally, proteins from the GFF with diagnostic potential were identified through mass spectrometry (MS) and B cell epitopes were predicted using the structure of the identified proteins.

#### MATERIAL AND METHODS

##### Ethical statement

This study was conducted according to the ethical guidelines of the Brazilian Health Ministry after being approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais state, Brazil under the number 382/11.

##### Serum samples

It was used a panel of serum samples from immunocompetent individuals that were well characterized parasitologically. Serum samples were collected from 160 subjects attended at the following laboratories: (a) Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas de Uberlândia (Groups 1 and 2); (b) Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses of the Universidade Federal de Uberlândia (Group 3); (c) Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro state, Brazil (Group 2); and (d) Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil (Group 2).

Group 1 (G1) consisted of 45 patients with definitive diagnosis of NCC, according to Del Brutto (2012), as follows: (a) all patients presented at least one type of clinical manifestation suggestive of NCC such as: epilepsy, cephalea, dizziness, dementia, faintness, hydrocephalus and no signs or symptoms of cysticercosis in other organs; (b) all patients came from or lived in a cysticercosis endemic area; (c) for immunodiagnosis, cerebrospinal fluid and/or

serum samples were positive in an ELISA test for the detection of anti-*Taenia* IgG; (d) they presented evidence of the parasite in neuroimaging, with the following characteristics: active NCC ( $n = 24$ ), where metacestodes were viable or in early degeneration, and inactive NCC ( $n = 21$ ), where metacestodes were completely degenerated, according to Sotelo *et al.* (1985).

Group 2 (G2) consisted of 65 patients with other parasitic infections: *Ascaris lumbricoides* ( $n = 5$ ), *Entamoeba histolytica/dispar* ( $n = 2$ ), *Enterobius vermicularis* ( $n = 6$ ), *E. granulosus* ( $n = 8$ ), *Giardia lamblia* ( $n = 8$ ), hookworm ( $n = 7$ ), *Hymenolepis nana* ( $n = 4$ ), *Schistosoma mansoni* ( $n = 4$ ), *Strongyloides stercoralis* ( $n = 8$ ), *Taenia* sp. ( $n = 5$ ) and *Trichuris trichiura* ( $n = 4$ ). Co-infected patients were also tested: hookworm + *A. lumbricoides* + *T. trichiura* ( $n = 1$ ), hookworm + *A. lumbricoides* ( $n = 1$ ), *Entamoeba histolytica/dispar* + *G. lamblia* ( $n = 1$ ) and *H. nana* + *E. vermicularis* ( $n = 1$ ). At least three fecal samples were obtained and tested by the parasitological method of Ritchie (1948). Patients infected with *Echinococcus* were considered positive after a positive diagnosis by ultrasound, CT and serology tests and confirmation by parasitological examination of cystic fluid after surgery. All cases underwent surgery for hydatid disease. Serum samples from patients infected with *Echinococcus granulosus* were received from the Laboratório de Helmintos Parasitos de Vertebrados do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro state, Brazil and from the Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil.

Group 3 (G3) comprised 50 apparently healthy individuals, based on their clinical presentation. Although they came from a cysticercosis endemic area, all volunteers from this group did not present evidence of household contact with *T. solium* infection or a history of taeniasis or cysticercosis. In addition, these individuals had three fecal samples negatively tested by the parasitological methods of Baermann–Moraes (Baermann, 1917; Moraes, 1948) based on the positive larval thermo-hydro-tropism and Lutz method (Lutz, 1919), a gravity sedimentation technique.

##### *Taenia saginata* metacestodes obtention

*Taenia saginata* metacestodes were obtained from naturally infected cattle at the Triângulo Mineiro region, Minas Gerais state, Brazil. Infected cattle came from abattoirs and were slaughtered in accordance with the inspection technique recommended by the Federal Inspection Service. *Taenia saginata* metacestodes were obtained by dissecting muscles and only those in the vesicular stage were collected, washed in saline solution (0.15 M NaCl) four times and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Total SE from *T. saginata* metacestodes preparation

SE was obtained by using 50 *T. saginata* metacestodes resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing a protease inhibitors cocktail: 100  $\mu$ L mL $^{-1}$  of complete ULTRA extract (Tablets, Mini, EASYpac, Roche, Alemanha) and disrupted by five cycles of freezing, maceration and thawing/sonication until no integral metacestodes were observed. After a 2-h incubation period at 4 °C, under constant shaking, the suspension was centrifuged (12400  $\times$  g, 30 min, 4 °C) and the supernatant was assayed according to the procedure of Bradford (1976) for protein quantification and stored at -20 °C.

### Fractionation procedure and antigen analysis

Gel filtration fraction (GFF) was obtained by gel filtration chromatography from the SE and developed in column (glass, size 1.5  $\times$  50 cm $^2$ , max volume 89 mL, cross-sectional area 1.77 cm $^2$ , Bio-Rad Laboratories, USA) containing resin (Sephacryl S-100 High Resolution, GE Healthcare, USA). A minimum protein concentration of 6000  $\mu$ g mL $^{-1}$  of SE (4 mL) was loaded and column was previously equilibrated with five times the resin volume (80 mL) of PBS (4–8 °C). After centrifugation and addition of protease inhibitor cocktail [composed of substances such as benzethonium chloride,  $\alpha$ -toluenesulphonyl fluoride, disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate and 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, Bestatin, [(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-L-leucine hydrochloride, pepstatin, Leupeptin hemisulphate 2-oxiranecarboxylic acid, Trypsin inhibitor (pancreatic basic)], SE was applied to the column until total influx, then 4 mL of PBS (4–8 °C) was pumped to prevent mixing chamber formation. Aliquots (1 mL) were collected automatically (Model 2110, Bio-Rad, USA). The final volume collected corresponded to two times the resin volume (160 mL). Aliquots were monitored for the presence of protein according to Bradford (1976). The chromatogram was generated, and peak from tubes 22–26 was defined as GFF. After use, the resin was washed with PBS and stored (4–8 °C) in PBS with sodium azide (0.1%).

### Electrophoretic analysis

Total SE and the collected fractions were analysed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis 12% (SDS-PAGE) under non reducing conditions, as described by Laemmli (1970) and GFF was selected considering preliminary ELISA results. Proteins were visualized in SDS-PAGE after Coomassie Brilliant Blue staining (Dong *et al.* 2011).

Analysis was performed using a graphical method to generate protein lane profile plot of each antigenic

fraction, by Image J version 1.44 software (National Institutes of Health, Bethesda, USA); and then peaks related to bands were compared with protein standard marker (Real Biotech, RECOM™ Blue Wide Range Prestain Marker, Taiwan) to estimate their relative molecular weight.

### ELISA to detect anti-*Taenia* IgG

ELISA using SE and GFF was carried out according to Nunes *et al.* (2013). Low-affinity polystyrene microplates (Interlab, Brazil) were coated with antigenic preparations (10  $\mu$ g mL $^{-1}$ ) in carbonate bicarbonate buffer, pH 9.6 and incubated overnight at 4 °C. Then, plates were washed once, for 5 min with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Serum samples were diluted 1:200 in PBS-T containing 3% of skimmed milk (PBS-TM) and incubated for 45 min at 37 °C. After three washes with PBS-T, 5 min each, the immunoenzymatic conjugate (peroxidase-goat anti-human IgG, Fc specific; Sigma) was added diluted 1:2000 in PBS-T and incubated for 45 min at 37 °C. Subsequently, another step of washing was performed and the assay was developed by adding the enzyme substrate consisting of hydrogen peroxide and orthophenylenediamine (OPD) in 0.1 M citrate phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) buffer pH 5.5 for 15 min. Reaction was interrupted by adding 25  $\mu$ L per well of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbance was determined at 492 nm in an ELISA reader (TP Reader, Thermo Plate, Brazil).

### Immunoblotting

For membrane preparation SE and GFF were submitted to SDS-PAGE 12% and gels were transferred using a Trans-Blot SD Semy Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to nitrocellulose membranes (0.20  $\mu$ m, Bio-Rad), as described by Towbin *et al.* (1979). Membranes were cut into strips and immunoblotting was performed as described by Nunes *et al.* (2013), with modifications. Strips containing SE and GFF were blocked with 2.5% PBS-TM for 2 h at room temperature and washed once, for 5 min with PBS-TM 1%. After, samples [a pool from the most reactive samples in ELISA from G1 (*n* = 5) and G3 (*n* = 5)] diluted 1:25 in 1% PBS-TM were added and incubated overnight at 4 °C. Then, after washing five times with PBS-T 0.05%, 5 min each, strips were incubated for 2 h at room temperature with peroxidase-labelled goat anti-human IgG conjugate (whole molecule, Sigma) diluted at 1:1500 in PBS-TM 1%. Subsequently, another step of washing was performed using PBS-T 0.05% and the assay was developed by adding hydrogen peroxide and 3,3'-diaminobenzidine tetra hydrochloride (Sigma) for 3 min. Reaction was stopped by washing strips with water.

### MS and protein identification

After confirmation by the immunological tests (ELISA and immunoblotting) the band of interest at GFF was elected and excised manually with a clean scalpel from the gel, previously stained with Coomassie Brilliant Blue, for further characterization through MS. All materials were previously washed with methanol to reduce contaminants. The excised gel band was washed with acetonitrile and stored ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) until processing. Sample was dried by vacuum centrifugation, and digested with trypsin. Analyses were carried out in the Laboratório de Espectrometria de Massas of the Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) of the Universidade de São Paulo (USP), São Paulo state, Brazil. Sample was applied to an EASY nanoLC II-LTQ Orbitrap Velos-ETD (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) coupled to nano liquid chromatography (EASY-nanoLC II). Peptides were loaded in a trap column packed with C-18 resin (reverse-phase high-performance liquid chromatography; RP-HPLC) and sequentially eluted using a gradient from acetonitrile for 45 min, separated and analysed (LTQ-OrbitrapVelos ETD). Data search was conducted in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Search was done using *Taenia* genus considering identified proteins with the highest score, coverage rate and unique peptides.

### Prediction of linear B-cell epitopes

The 3D models of the proteins were constructed using Swiss-Model software (<http://swissmodel.expasy.org/>) and UCSF Chimera (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, CA, USA). As templates we used tertiary structures of other proteins to construct the models of *Taenia* identified proteins. The prediction of linear B-cell epitopes was performed by BepiPred platform (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>).

### Statistical analyses

Analyses were performed using GraphPad software package 5.0 (GraphPad Software Inc., USA). Cut-off points were established using a two-graph receiver operating characteristic curve (TG-ROC) (Greiner *et al.* 1995) based on ELISA results from positive (G1) and negative samples (G2 and G3). ELISA reactivity index (RI) was obtained by the ratio between OD and cutoff. RI greater than the optimum point of reaction for each extract were considered positive ( $\text{RI} > 1$ ). Sensitivity (Se) and specificity (Sp) were calculated according to Youden (1950). ROC curves were built to describe the tests (Martinez *et al.* 2003). The area under ROC curve

(AUC), an index of diagnostic accuracy, was calculated (Hanley and McNeil, 1982) and compared (Hanley and McNeil, 1983). Likelihood ratios (LR), an efficiency diagnostic parameter (Greiner *et al.* 1995) were calculated: LR+ indicates how likely patients with NCC are to have a positive test result compared with other patients; and LR- define the probability of having a negative test for patients with NCC. Probability ( $P$ ) values of  $<0.0001$  were regarded as significant and 95% confidence intervals (CI) were provided for Se, Sp and AUC.

## RESULTS

### Diagnostic performance of SE and GFF through ELISA

Figure 1A shows ELISA reactivity of the tested serum samples using both antigenic preparations (SE and GFF). Positivity rates for SE and GFF were, respectively: 84.4% (38/45) and 93.3% (42/45) at G1; 15.3% (10/65) and 9.2% (6/65) at G2 and 12% (6/50) and 4% (2/50) at G3. Cross-reactivity in G2 using SE was due to samples from patients infected with hookworm (2/7), *S. mansoni* (1/4), *S. stercoralis* (2/8), *G. lamblia* (2/8), *E. histolytica/dispar* (1/2), *H. nana* + *E. vermicularis* (1/1) and *E. granulosus* (1/8). When testing GFF cross-reactive samples were from patients with hookworm (1/7), *S. stercoralis* (1/8), *E. histolytica/dispar* (2/2), *Taenia* sp. (1/1) and *E. granulosus* (1/8).

GFF reached the best diagnostic parameters (Fig. 1B). Comparing ROC curves, GFF was the most efficient to distinguish patients with NCC (G1) from control groups (G2 and G3) reaching a high AUC value ( $\text{AUC} = 0.990$ ,  $z = -3.6$ ;  $P = 0.0003$ ). The LR+ values for SE ( $\text{LR}+ = 6.07$ ) indicated only a moderate probability of a true positive NCC case, while for GFF this index indicated a high diagnostic value ( $\text{LR}+ = 13.42$ ). This efficiency of GFF can be corroborated by analysing LR- value ( $\text{LR}- = 0.07$ ), this parameter virtually exclude the chance of the infection (Jaeschke *et al.* 1994).

### Electrophoretic profile and Immunoblotting

Proteins with molecular weight varying from 64 to 68 kDa, showing high concentration bands, were observed at GFF (Fig. 2A). Considering the promising results obtained with ELISA tests using GFF, immunoblotting was performed and high molecular weight bands ( $\geq 70$  kDa) were eliminated for NCC diagnosis in agreement with Barcelos *et al.* (2007). Figure 2B showed the immunoblotting reactivity profile when using SE and GFF. For SE with G1 pool, the following immunodominant proteins were recognized: 24, 64–68, 70, 80, 86, 100 and  $>140$  kDa. Observing GFF there was

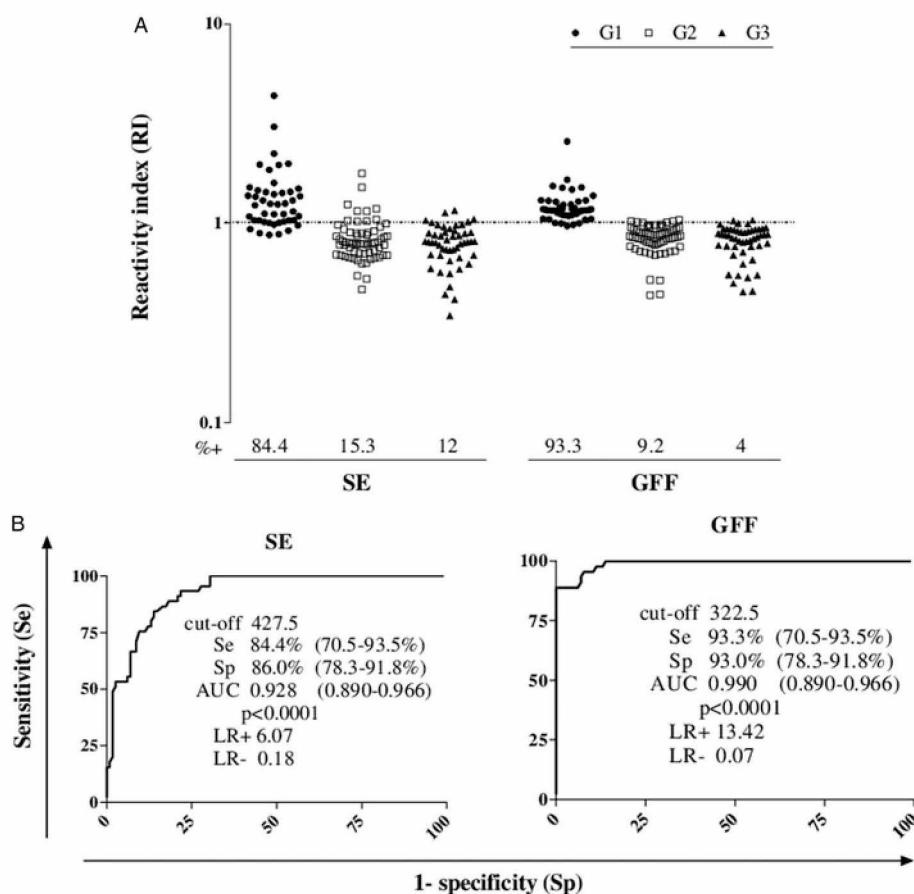


Fig. 1. ELISA using total saline extract (SE) from *T. saginata* metacestodes and gel filtration fraction (GFF) for detection of IgG anti-*Taenia* in serum samples from 45 patients with NCC (G1), 65 patients with other parasitic infections (G2), and 50 healthy individuals (G3). RI for each extract were considered positive (RI > 1) (A). Receiver operating characteristic curves (ROC) indicating reaction cut-off point, sensitivity (Se), specificity (Sp), area under curve (AUC), likelihood ratios (LR+ and LR-) and AUC comparison according to Hanley and McNeil (1983), using total SE from *T. saginata* metacestodes and GFF (B), 95% CI for Se, Sp and AUC are shown in brackets.

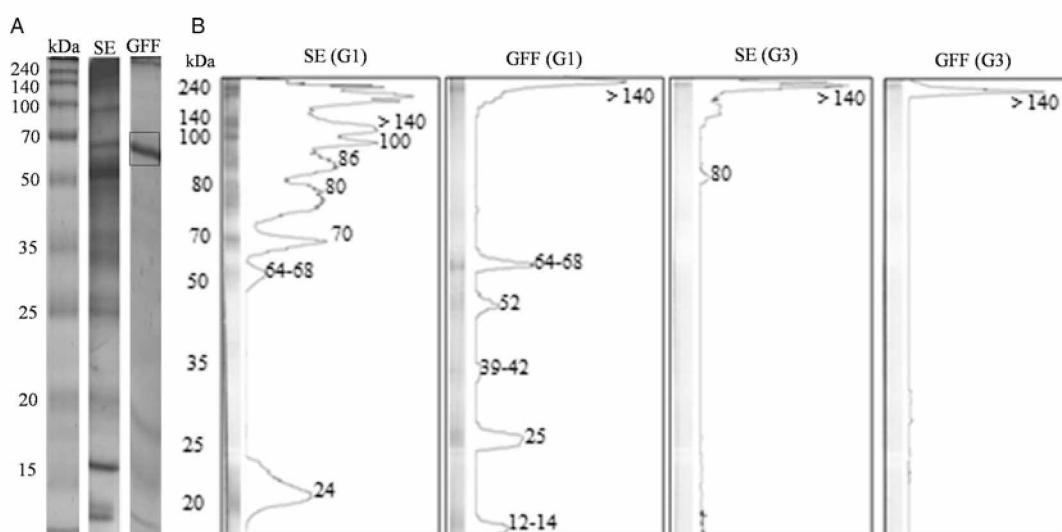


Fig. 2. Electrophoretic profiles of the total saline extract (SE) from *T. saginata* metacestodes and gel filtration fraction (GFF) obtained after gel filtration chromatography (SDS-PAGE) (A). Immunoblotting to detect anti-*Taenia* sp. IgG antibodies in pool of serum samples from patients with NCC (G1 pool) and healthy individuals (G3 pool). Peaks of intensity, indicative of the bands detected, were generated by ImageJ version 1.44. Molecular weight standard in kilodaltons (kDa) (B).

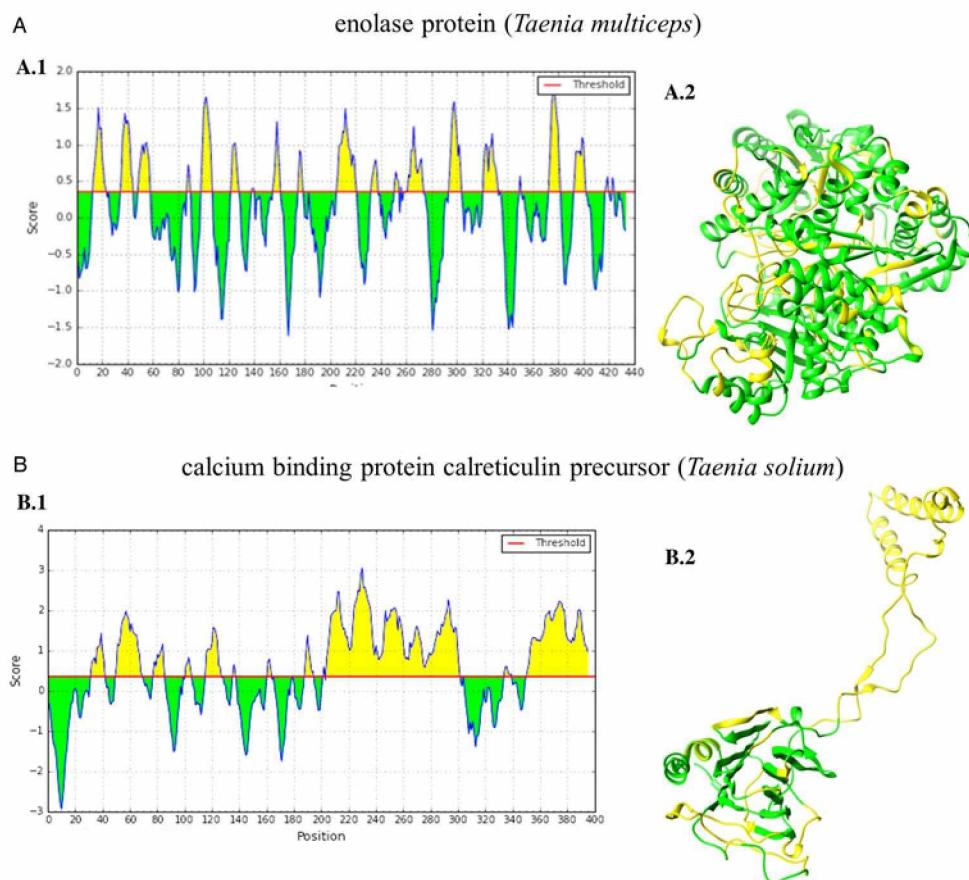


Fig. 3. Protein identification: enolase (*Taenia multiceps*) (A) and calcium-binding protein calreticulin precursor (*T. solium*) (B) through MS and *in silico* analysis by predicting linear B-cell epitopes (BepiPred). Amino acid residues are coloured in yellow in the graph when they reach scores above the threshold, where the X-axis correspond to the positions of the residues in the sequence and Y-axis score (A.1 and B.1). Marking of antigenic determinants (yellow) predicted for B-cells. 3D modelling of the proteins showed the B-cell epitopes (yellow) and not predicted (green) (A.2 and B.2).

the recognition of the following bands: 12–14, 25, 39–42, 52, 64–68 and >140 kDa. There was no recognition of bands related to NCC diagnosis with G3 pool for both antigens. Special attention should be paid to the 64–68 kDa band, an important marker for NCC diagnosis that clearly appeared at GFF.

#### Protein identification

Figure 3A and B shows proteins of diagnostic interest for NCC by MS. In GFF the band with 64–68 kDa (the same molecular weight of a known marker for NCC diagnosis) was selected. Table 1 shows the identified proteins according to score, unique peptides and coverage.

Considering the absence of the whole sequence from *T. solium* enolase and the conserved structure of this protein at *Taenia* genus we used the structure of *Taenia multiceps* to perform *in silico* analyses for B-cell epitopes prediction (Fig. 3A.1, A.2, B.1 and B.2). Using enolase (*T. multiceps*) 18 epitopes were predicted. For the calcium binding protein calreticulin precursor (*T. solium*) 10 epitopes were predicted. B-cell epitopes are shown on three-

dimensional (3D) modelling in yellow (Fig. 3A.2 and B.2).

#### DISCUSSION

The development of a highly specific, sensitive and reliable assay to detect the presence of anti-*Taenia* antibodies is important to improve the diagnosis of human NCC. Thus, efforts have been done to develop new antigenic fractions and other antigenic sources as heterologous ones.

*Taenia saginata* heterologous antigens showed to be useful in NCC diagnosis through ELISA and immunoblotting due to the cross-reactivity with *T. solium* antigens confirming the presence of common antigenic determinants (Espíndola *et al.* 2005). *Taenia saginata* metacestodes can be obtained in considerable quantities, due to the habitual diet in many countries, mainly based on beef consumption (Morakote *et al.* 1992; Oliveira *et al.* 2007, 2009).

Immunological tests are considered important methods to confirm clinical findings and to give diagnostic help when clinical manifestations are non-specific, as happens in NCC. ELISA is a

Table 1. Protein characterization of fraction obtained by gel filtration on S-100 resin of the saline extract (SE) from *T. saginata* metacestodes identified by MS and subjected to search in the database for the genus *Taenia*

Accession <sup>a</sup>	Protein	Score <sup>b</sup>	Unique peptides <sup>c</sup>	Sequence	Coverage (%)	Molecular weight SDS-PAGE (kDa)	Molecular weight MS (kDa)	pI
386873714	Enolase ( <i>Taenia multiceps</i> )	28.52	7	AVYAGEHFRNPL NVNEVIAPALLK NVNEVIAPALLKEK YNQLLRIEEELGSK LAmQEFmILPTGAK SGTEDSTIADIVVGLR AGIQIVGDDLTVTNPER	20.32	64–68	46.4	7.19
14029538	Calcium-binding protein calreticulin precursor ( <i>Taenia solium</i> )	40.60	8	GDFDDKEDGGmR HEQNIDcGGGYVK TFAYIGLDLWQVK SKYDESNLGLcEYAKPK GDFDDKEDGGmRTTQDAR LLGESFKPDDFHGESPYEImFGPDIcGYDKK SGTIFDNFIVSDNVSeQAHAEYWQKSG TIFDNFIVSDNVSeQAHAEYWQKR	30.13	64–68	45.5	4.56

pI, isoelectric point.

<sup>a</sup> Protein Data Bank National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

<sup>b</sup> Search platforms attribute scores reflecting similarity between the experimental fragmentation spectrum (measured) and the theoretical spectra of peptides from a given database (Granholm and Käll, 2011).

<sup>c</sup> Peptide one is defined as a peptide, regardless of its length, which exists only on a protein of interest a proteome, even this peptide appears more than once in the same protein (Zhao and Lin, 2010).

valuable tool to detect many parasitic infections and provides the possibility for the simultaneous processing of many samples, reducing the cost for the analyses. This test is also quantitative and its results are not subjected to individual interpretation. However, appropriate antigens, easy producible, and highly sensitive and specific are required (Zimic *et al.* 2009).

Cross-reactions between crude antigens and epitopes from other helminths are the major challenge in the diagnostic tests. A simple fractionation is a viable tool to increase positive reactions minimizing cross-reactivity (Gonçalves *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2010, 2013), maintaining a certain antigenic complexity that leads to an accurate diagnosis, important for patient management, understanding the epidemiology of the disease and establishing preventive measures. Our study shows that even using a simple chromatography procedure we can easily fractionate SE obtaining an antigenic fraction enriched with proteins with diagnostic potential that can be readily used improving specificity and sensitivity ELISA indexes to detect NCC in serum samples. Several studies have demonstrated the usefulness of the partial fractionation to obtain antigenic fractions with increased diagnostic parameters using other chromatographic approaches. Fractionation techniques [detergent Triton X-114 (Machado *et al.* 2007; Gonçalves *et al.* 2010), affinity for concanavalin A and jacalin (Nunes *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2010), ion-exchange chromatography with carboxymethyl sepharose and diethylaminoethyl sepharose (DEAE)] (Nunes *et al.* 2013; Ribeiro *et al.* 2014) lead to antigenic fractions with high potential in NCC immunodiagnosis using *T. saginata* or *T. solium* metacestodes.

A previous study successfully used the homologous antigen from *T. solium* metacestodes to detect porcine cysticercosis, the band of 14 kDa was obtained from crude cyst fluid of *T. solium* metacestodes by two-step chromatography: the first step gel filtration (Sephacryl S-300) and the second using anion exchange column (Mono Q HR 5/5) on HPLC (Assana *et al.* 2007). In our study, GFF was obtained after a single-step chromatography and this fraction showed higher diagnostic parameters if compared with SE. The major advantages of using gel filtration chromatography are the minimal cost, simple and easy extraction and high efficiency. The GFF revealed antigenic components with 64–68 kDa, other studies showed the importance of these antigenic markers. Shiguekawa *et al.* (2000) found that the 47, 52, 64–68 kDa were immunodominant when serum samples were tested in immunoblotting. Using another chromatography technique and the heterologous antigen from *T. saginata* metacestodes, Nunes *et al.* (2013) obtained the DEAE S2 fraction with bands with 39 to 42, 47–52 and 64–68 kDa with potential applicability

in active NCC diagnosis (Nunes *et al.* 2013); however, these proteins were not identified yet.

Recent advances in MS and proteomics have shown promising results for the diagnosis of parasitic infections (Vasoo and Pritt, 2013), since these tools are helpful for antigen identification and characterization supporting the development of accurate diagnostic tests. The prediction of B-cell epitopes was performed at the structure of the identified proteins (enolase and calreticulin), and exposed regions of these molecules could be antibody targets.

Enolase is a multifunctional glycolytic enzyme, that catalyse the reversible dehydration of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate and plasminogen receptor on the surface of several pathogens (Ramajo-Hernández *et al.* 2007; Cayir *et al.* 2014). Furthermore, the protein can also induce host-protective immunity and is considered a potential vaccine candidate being evaluated in several helminths (Yang *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012). Calreticulin is a highly conserved multifunctional protein found mainly at the lumen of the endoplasmic reticulum in almost all eukaryotic cells and is involved in the homeostasis of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , regulating diverse cellular functions, such as secretion, contraction–relaxation, adhesion, protein synthesis, differentiation, organogenesis and gene expression. This protein is also important regulating *T. solium* development at the tissues, especially during germ cell development and embryogenesis (Mendlovic *et al.* 2004).

In conclusion, we developed a rapid, simple, sensitive and specific fraction to detect specific antibodies against *Taenia* sp. infection. Proteins that were identified here are composed of immunodominant peptides suggesting the potential applicability in human NCC diagnosis with implications in clinical practice and as screening tool.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Dra. Rosângela Rodrigues e Silva of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro state, Brazil and Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul state, Brazil, by donation of serum samples from patients infected with *Echinococcus granulosus*.

#### FINANCIAL SUPPORT

This research was supported by the Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-3200601004 M-8) (to D. S. N.), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-CBB-PPM-00396-13) (to J. M. C. C), Rede de Pesquisa em Doenças Infecciosas Humanas e Animais do Estado de Minas Gerais (CDS-RED-00013-14) (to J. M. C. C and J. P. C. J), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-302426/2012-4) (to J. M. C. C) and by the Universidade Federal de

Uberlândia (UFU), (to D. S. N, H. T. G., V. S. R., J. P. C. J. and J. M. C. C.), Brazil.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare to have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Arriola, C. S., Gonzalez, A. E., Gomez-Puerta, L. A., Lopez-Urbina, M. T., Garcia, H. H. and Gilman, R. H. (2014). New insights in cysticercosis transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**, e3247.
- Assana, E., Kanobana, K., Tume, C. B., Zoli, P. A., Nguekam, J. P., Geerts, S., Berkvens, D. and Dorny, P. (2007). Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. *Research in Veterinary Science* **82**, 370–376.
- Baermann, G. (1917). Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededel mit H. Genesk Laboratories Weltevreden, Feestbundel, Batavia, pp. 41–47.
- Barcelos, I. S., Mineo, J. R., Oliveira-Silva, D. A., Ferreira, M. S., Moura, L. P., Biondi, G. F. and Costa-Cruz, J. M. (2001). 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* **6**, 219–226.
- Barcelos, I. S., Moura, L. P., Costa, V. P., Ferreira, M. S. and Costa-Cruz, J. M. (2007). *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* **102**, 713–717.
- Bradford, M. A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Carpio, A. and Romo, M. L. (2015). Multifactorial basis of epilepsy in patients with neurocysticercosis. *Epilepsia* **56**, 973–974.
- Cayir, E., Erdemir, A., Ozkan, E., Topuzogullari, M., Bolat, Z. B., Akat, A. and Turgut-Balik, D. (2014). Cloning of intron-removed enolase gene and expression, purification, kinetic characterization of the enzyme from *Theileria annulata*. *Molecular Biotechnology* **56**, 689–696.
- Chen, N., Yuan, Z. G., Xu, M. J., Zhou, D. H., Zhang, X. X., Zhang, Y. Z., Wang, X. W., Yan, C., Lin, R. Q. and Zhu, X. Q. (2012). *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. *Vaccine* **30**, 3478–3482.
- Coral-Almeida, M., Gabriël, S., Abatih, E. N., Praet, N., Benitez, W. and Dorny, P. (2015). *Taenia solium* human cysticercosis: a systematic review of sero-epidemiological data from endemic zones around the world. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**, e0003919.
- Costa, J. M., Ferreira, A. W., Makino, M. M. and Camargo, M. E. (1982). Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **24**, 337–341.
- Del Brutto, O. H. (2012). Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revised. *Pathogens and Global Health* **106**, 299–304.
- Del Brutto, O. H. and Garcia, H. H. (2015). *Taenia solium* cysticercosis – the lessons of history. *Journal of the Neurological Sciences* **359**, 392–395.
- Del Brutto, O. H., Lama, J., Zambrano, M. and Del Brutto, V. J. (2014). Neurocysticercosis is a neglected microbleed mimic. A cautionary note for stroke neurologists. *European Neurology* **72**, 306–308.
- Dong, W. H., Wang, T. Y., Wang, F. and Zhang, J. H. (2011). Simple, time-saving dye staining of proteins for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using Coomassie blue. *PLoS ONE* **6**, e22394.
- Espíndola, N. M., Iha, A. H., Fernandes, I., Takayanagui, O. M., Machado, L. R., Livramento, J. A., Mendes-Maia, A. A., Peralta, J. M. and Vaz, A. J. (2005). Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoadsorption chromatography. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 3178–3184.
- Gabriël, S., Johansen, M. V., Pozio, E., Smit, G. S., Devleesschauwer, B., Allepuz, A., Papadopoulos, E., Van Der Giessen, J. and Dorny, P. (2015). Human migration and pig/pork import in the European Union: what are the implications for *Taenia solium* infections? *Veterinary Parasitology* **213**, 38–45.
- Gonçalves, F. A., Machado, G. A., Oliveira, H. B., Rezende, M. T., Mineo, J. R. and Costa-Cruz, J. M. (2010). Hydrophobic fraction of *Taenia saginata* metacestodes, rather than hydrophilic fraction, contains immunodominant markers for diagnosing human neurocysticercosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**, 254–259.
- Gonzales, I., Rivera, J. T. and Garcia, H. H. (2016). Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Parasite Immunology* **38**, 136–146.
- Granholm, V. and Käll, L. (2011). Quality assessments of peptide-spectrum matches in shotgun proteomics. *Proteomics* **11**, 1086–1093.
- Greiner, M., Sohr, D. and Göbel, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *Journal of Immunological Methods* **185**, 123–132.
- Hanley, J. A. and McNeil, B. J. (1982). The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* **143**, 29–36.
- Hanley, J. A. and McNeil, B. J. (1983). A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* **148**, 839–843.
- Husain, N., Shukla, N., Kumar, R., Husain, M., Chaturvedi, A., Agarwal, G. G. and Gupta, R. K. (2008). ELISA in the evaluation of therapeutic response to albendazole in neurocysticercosis. *Journal of Infection* **56**, 65–73.
- Jaeschke, R., Guyatt, G. H. and Sackett, D. L. (1994). Users' guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. *Journal of the American Medical Association* **271**, 703–707.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lutz, A. (1919). O *Schistosoma mansoni* e a schistosomose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **11**, 121–125.
- Machado, G. A., Santiago, F. M., Mineo, J. R. and Costa-Cruz, J. M. (2007). Assessment of antigenic fractions of varying hydrophobicity from *Taenia solium* metacestodes for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health* **12**, 1369–1376.
- Madrazo, I. (2013). Overview of neurocysticercosis. *World Neurosurgery* **79**, 262–263.
- Martinez, E. Z., Louzada-Neto, F. and Pereira, B. B. (2003). A curve ROC para testes diagnósticos. *Cadernos de Saúde Coletiva* **11**, 7–31.
- Martins-Melo, F. R., Ramos, A. N., Jr., Cavalcanti, M. G., Alencar, C. H. and Heukelbach, J. (2016). Neurocysticercosis-related mortality in Brazil, 2000–2011: epidemiology of a neglected neurologic cause of death. *Acta Tropica* **153**, 128–136.
- Mendlovic, F., Ostoia-Saloma, P., Solis, C. F., Martinez-Ocaña, J., Flisser, A. and Laclette, J. P. (2004). Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *Journal of Parasitology* **90**, 891–893.
- Moraes, R. G. (1948). Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estrongiloidíase no Brasil. *Revista de Saúde Pública* **1**, 507–624.
- Morakote, N., Nawachareon, W., Sukonthasun, K., Thammasonthi, W. and Khamboonruang, C. (1992). Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis. *Southeast Asian Ministers of Education Council Central Coordinating Board for Tropical Medicine and Public Health* **23**, 77–81.
- Ndimubanzi, P. C., Carabin, H., Budke, C. M., Nguyen, H., Qian, Y. J., Rainwater, E., Dickey, M., Reynolds, S. and Stoner, J. A. (2010). A systematic review of the frequency of neurocysticercosis with a focus on people with epilepsy. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**, e870.
- Nunes, D. S., Ribeiro, V. S., Manhani, M. N. and Costa-Cruz, J. M. (2010). Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **68**, 259–264.
- Nunes, D. S., Gonzaga, H. T., Ribeiro, V. S., Cunha-Junior, J. P. and Costa-Cruz, J. M. (2013). *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **76**, 36–41.
- O'keefe, K. A., Eberhard, M. L., Shafir, S. C., Wilkins, P., Ash, L. R. and Sorvillo, F. J. (2014). Cysticercosis-related hospitalizations in the United States, 1998–2011. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **10**, 14–0506.
- Oliveira, H. B., Machado, G. A., Cabral, D. D. and Costa-Cruz, J. M. (2007). Application of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the serological diagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitology Research* **101**, 1007–1013.
- Oliveira, H. B., Machado, G. A., Gonçalves-Pires, M. R. F., Moura, L. P. and Costa-Cruz, J. M. (2009). Saline extract of *Taenia saginata* metacestodes as alternative antigen for the immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. *Parasitology Research* **105**, 169–174.
- Oliveira, H. B., Machado, G. A., Mineo, J. R. and Costa-Cruz, J. M. (2010). *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions without affinity

- to concanavalin A are an important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Clinical and Vaccine Immunology* **17**, 638–644.
- Ramajo-Hernández, A., Pérez-Sánchez, R., Ramajo-Martín, V. and Oleaga, A.** (2007). *Schistosoma bovis*: plasminogen binding in adults and the identification of plasminogen-binding proteins from the worm tegument. *Experimental Parasitology* **115**, 83–91.
- Ribeiro, V. S., Nunes, D. S., Gonzaga, H. T., Cunha-Júnior, J. P. and Costa-Cruz, J. M.** (2014). Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacestode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. *Parasitology Research* **113**, 2569–2575.
- Ritchie, L. S.** (1948). An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bulletin of the National Service of Army – Medical Department* **8**, 326–334.
- Rizvi, S. A., Saleh, A. M., Frimpong, H. A., Mohiy, H. M., Ahmed, J., Edwards, R. D. and Ahmed, S. S.** (2016). Neurocysticercosis: a case report and brief review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* **9**, 100–102.
- Shiguekawa, K. Y., Mineo, J. R., Moura, L. P. and Costa-Cruz, J. M.** (2000). ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Tropical Medicine and International Health* **5**, 443–449.
- Sotelo, J., Guerrero, V. and Rubio, F.** (1985). Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. *Archives of Internal Medicine* **145**, 442–445.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354.
- Vasoo, S. and Pritt, B. S.** (2013). Molecular diagnostics and parasitic disease. *Clinics in Laboratory Medicine* **33**, 461–503.
- Yang, J., Qiu, C., Xia, Y., Yao, L., Fu, Z., Yuan, C., Feng, X. and Lin, J.** (2010). Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. *Parasitology Research* **107**, 667–677.
- Youden, W. J.** (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* **3**, 32–35.
- Zhao, Y. and Lin, Y. H.** (2010). Whole-cell protein identification using the concept of unique peptides. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **8**, 33–41.
- Zimic, M., Pajuelo, M., Rueda, D., López, C., Arana, Y., Castillo, Y., Calderón, M., Rodriguez, S., Sheen, P., Vinetz, J. M., Gonzales, A., García, H. H., Gilman, R. H.** (2009). Utility of a protein fraction with cathepsin L-Like activity purified from cysticercus fluid of *Taenia solium* in the diagnosis of human cysticercosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **80**, 964–970.