

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

Tecnologia IgY aplicada no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana utilizando fração de *Taenia crassiceps* obtida por hidrofobicidade

Guilherme Carrara Moreira Paiva

Uberlândia-MG

Fevereiro-2019

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

Tecnologia IgY aplicada no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana utilizando fração de *Taenia crassiceps* obtida por hidrofobicidade

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Guilherme Carrara Moreira Paiva

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Uberlândia-MG
Fevereiro-2019

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

P149t Paiva, Guilherme Carrara Moreira, 1992
2019 Tecnologia IgY aplicada no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana utilizando fração de *Taenia crassiceps* obtida por hidrofobicidade [recurso eletrônico] / Guilherme Carrara Moreira Paiva.
- 2019.

Orientadora: Julia Maria Costa-Cruz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1269>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Cisticercose cerebrospectral. 3. Imunoglobulinas. 4. Imunodiagnóstico. I. Costa-Cruz, Julia Maria, 1956, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Guilherme Carrara Moreira Paiva

“Tecnologia IgY aplicada no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana utilizando fração de *Taenia crassiceps* obtida por hidrofobicidade”

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

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 15 de fevereiro de 2019.

Prof. Dr. Lucas Silva de Faria – ICIAG/UFU Monte Carmelo

Dra. Vanessa da Silva Ribeiro – ICBIM/UFU

Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz (orientadora) – ICBIM/UFU

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por sempre me atender, apoiar e acreditar.

À Universidade Federal de Uberlândia por ter me concedido a honra de tê-la representado durante esses oito anos de ensino superior.

À State University of New York e seus docentes e técnicos, pela contribuição em minha formação profissional durante a graduação sanduíche.

À CAPES, ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio técnico-financeiro durante todos os meus anos de graduação e pós.

A todos os professores de minha história acadêmica, especialistas, mestres, doutores e pós-doutores, desde a pré-escola até aqui.

Aos colegas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, em especial à MSc. Gabriela Borges da Silva, por ter me auxiliado e ensinado de maneira única e fundamental durante o desenvolvimento deste trabalho.

À MSc. Isabela Pacheco Borges, do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais pelo auxílio e tempo cedido no decorrer de boa parte das atividades experimentais.

À Dra. Vanessa da Silva Ribeiro pelo auxílio indispensável na parte final do trabalho e pelas sugestões propostas na banca de defesa.

À banca de qualificação, composta pelos doutores Jonny Yokosawa, Daniela da Silva Nunes e Lucas Silva de Faria, pelas sugestões e modificações propostas ao presente trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Julia Maria Costa Cruz, por ter me confiado e permitido realizar este trabalho, mesmo com pouca experiência na área, e por ser exemplo de profissionalismo e ética no funcionalismo público.

Às famílias Carrara Moreira e Paiva pelo incentivo ao longo destes 22 anos de vida acadêmica, especialmente aos meus pais, Maria Alice Carrara e Maurício Paiva, irmã, Amanda Carrara e à minha madrinha Nalva Carrara, quem sempre tive como espelho de luta, motivação e perseverança pelos estudos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Taxonomia e descrição morfofisiológica de <i>Taenia solium</i>	13
1.2. Vias de transmissão e ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose	14
1.3. Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose.....	15
1.4. Relação parasito-hospedeiro e resposta imunológica na neurocisticercose	17
1.5. Aspectos clínicos da neurocisticercose	18
1.6. Critérios diagnósticos da neurocisticercose	19
1.6.1 Diagnóstico por neuroimagem e sorologia.....	20
1.7. <i>Taenia crassiceps</i> e a viabilidade do antígeno heterólogo no imunodiagnóstico da neurocisticercose.....	22
1.8. Utilização de frações antigênicas no imunodiagnóstico da neurocisticercose.....	23
1.9. Aplicação dos anticorpos IgY	24
2. OBJETIVOS	26
2.1 - Geral	26
2.2 - Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Aspectos éticos.....	27
3.2. Amostras de soros	27
3.3. Obtenção de metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i>	28
3.4. Galinhas	28
3.5. Produção do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i>	29
3.6. Fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de <i>Taenia crassiceps</i> com Triton X-114 para obtenção da fração hidrofóbica.....	29
3.7. Imunizações	30
3.8. Coleta de sangue, ovos e armazenamento das gemas	31
3.9. Fracionamento dos anticorpos IgY provenientes da gema.....	31
3.10. ELISA indireto para verificação da cinética de produção da IgY.....	31
3.11. ELISA indireto para verificação da maturação da avidéz de IgY	32
3.12. Purificação dos anticorpos IgY provenientes da gema	33
3.13. SDS-PAGE 12 % para avaliação dos anticorpos IgY fracionados e purificados.	34
3.14. <i>Dot blot</i> para confirmação da purificação dos anticorpos IgY.....	34
3.15. <i>Western blotting</i>	35
3.16. Imunofluorescência.....	35
3.17. ELISA sanduíche para detecção de imunocomplexos em soros humanos com NCC confirmada	36
3.18. Normas de biossegurança.....	37
3.19. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Caracterização antigênica do extrato salino total e da fração hidrofóbica de <i>Taenia crassiceps</i>	38
4.2. Avaliação do fracionamento e purificação dos anticorpos IgY.....	39
4.3. Avaliação da produção, maturação da avidéz e potencial de reconhecimento antigênico dos anticorpos IgY.....	43
4.4. Detecção de antígenos parasitários pela reação de imunofluorescência indireta.....	46
4.5. Aplicação dos anticorpos IgY no imunodiagnóstico da NCC humana.....	47
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	56

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

1D - unidimensional

6S - sexta semana

8S - oitava semana

A - fração aquosa

Abs- absorbância

ANOVA - *Analysis of variance* (análise de variância)

ApoB - apolipoproteína B

APS - *ammonium persulfate* (persulfato de amônio)

ASC - área sob a curva

BSA - *bovine serum albumin* – soroalbumina bovina

CBEA - Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEP/UFU - Comitê de Ética em Pesquisa da UFU

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CH2 - domínio da porção Fc do anticorpo que interage com o complemento

CH4 - domínio da porção Fc de alguns anticorpos que interage com receptores celulares

CRMV - Conselho Regional de Medicina Veterinária

C1q - uma das subunidades proteicas do componente C1 do complemento

cut-off - limiar de reatividade, ponto ótimo

D - fração detergente

DAB - diaminobenzidina

dd - destilada

DO - densidade ótica

dpi – dia pós infecção

DWI - *diffusion-weighted imaging* (imagens ponderadas em difusão)

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EITB - *enzyme-linked immunoelectrotransfer blot* (*blot* de imunoelectrotransferência enzimática)

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

Es - especificidade

EtTc - extrato salino total de *Taenia crassiceps*

F - *F statistics* (estatística F ou estatística de Fisher, definida pela razão da variância entre grupos e dentro grupos, no teste ANOVA)

Fc - *fragment crystallizable region* (região do fragmento cristalizável)

Fc-FcγR - receptor Fc gama da porção Fc da Imunoglobulina G

FhTc - fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

FIESTA - *fast imaging employing steady-state acquisition* (imagens rápidas que empregam aquisição de estado estacionário)

FITC - *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

GI - grupo de galinhas imunizadas com fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (FhTc);

GE – gradiente de eluição

GII - grupo de galinhas imunizadas com tampão fosfato-salino.

G1 - grupo com diagnóstico definitivo para neurocisticercose

G2 - grupo saudável

G3 - grupo com outras parasitoses

ggFcR – receptor Fc de *Gallus gallus*

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

HCl - ácido clorídrico

IA - índice avidéz

IC - intervalo de confiança

ICBIM - Instituto de Ciências Biomédicas

IE - índice ELISA

Ig - imunoglobulina

IgA - imunoglobulina A

IgE - imunoglobulina E

IgG - imunoglobulina G

IgM - imunoglobulina M

IgY - imunoglobulina Y

IL - interleucina

JBF - *jacalin-bound fraction* (fração ligada à jacalina)

JUF - *jacalin-unbound fraction* (fração não ligada à jacalina)

kDa - kilodalton

L - litro

LCR - líquido cefalorraquidiano

LLGP - *lentil lectin glycoprotein* (glicoproteína ligada à lectina de lentilha)

M - molar (mol/L)

m/v - concentração massa por volume

mA - miliamperagem

mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

n - número amostral

NaCl - cloreto de sódio

NCC - neurocisticercose

nm - nanômetro

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - ortofenilenodiamina

ORF - cepa de *Taenia crassiceps*

p - pool

P - nível de significância

PA - puro

P1 - precipitado de fração lipídica

P2 - precipitado obtido da solução de anticorpos após adição de sulfato de amônio

PBS - *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

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

PBS-TM - PBS-T acrescido de leite em pó Mólico

PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial hidrogeniônico

PM - peso molecular

R - fração da variação geral (de todos os dados, agrupando todos os grupos) que compara a variabilidade entre as médias dos grupos com a variabilidade dentro dos grupos

RIFI - reação de imunofluorescência indireta

RM - ressonância magnética

ROC - *receiver operating characteristic* (característica de operação do receptor)

RP⁺ - razão de probabilidade positiva

RP⁻ - razão de probabilidade negativa

SDS - *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE - *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

Se -sensibilidade

S - semana

S1 - sobrenadante de fração lipídica

S2 - sobrenadante obtido após adição de sulfato de amônio

SNC - sistema nervoso central

TBS -solução salina tamponada com Tris

TC - tomografia computadorizada

T CD4⁺ - linfócito T auxiliar do tipo CD4

T CD8⁺ - linfócito T citotóxico do tipo CD8

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

Th1 - linfócitos T *helper* 1

Th 2 - linfócitos T *helper* 2

TNF α - *tumor necrosis factor alpha* (fator de necrose tumoral-alfa)

Tris - tris (hidroximetil) aminometano

TX-114 - triton X-114

U⁺ - ureia positivo

U⁻ - ureia negativo

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

UNIUBE - Universidade de Uberaba

μ g - micrograma

μ L -microlitro

μ m - micrômetro

v/v - concentração volume por volume

WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

x - vezes

xg – vezes G (força gravitacional ou força centrífuga relativa)

RESUMO

A neurocisticercose humana (NCC) é uma doença mundialmente negligenciada causada pelo metacestódeo de *Taenia solium* e responsável por diversas complicações e desordens neurológicas. O objetivo deste estudo foi utilizar anticorpos IgY específicos produzidos por galinhas de postura imunizadas com antígenos da fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (FhTc) no imunodiagnóstico da NCC humana. Anticorpos obtidos a partir da gema de ovos de galinhas foram fracionados, purificados e avaliados quanto ao potencial de produção e reconhecimento antigênico (anti-FhTc). Ensaio ELISA indireto e *Western blotting* foram realizados para avaliação da cinética de produção e maturação da avidéz dos anticorpos IgY anti-FhTc ao longo da atividade experimental. Os anticorpos IgY que apresentaram índices de avidéz superiores a 85 % foram purificados e aplicados no imunodiagnóstico da NCC. Os anticorpos IgY específicos anti-FhTc purificados foram testados em reação de imunofluorescência indireta e reconheceram antígenos parasitários extra e intrategumentares em cortes histológicos de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps*. Ensaio ELISA sanduíche foram realizados para detecção de imunocomplexos circulantes formados por IgG e antígenos de *T. solium* em soros humanos. Um total de 114 amostras de soro foram analisadas e divididas em três grupos: Grupo 1 (n = 44), composto por indivíduos com NCC confirmada, subdivididos em NCC ativa (n = 22) e inativa (n = 22); Grupo 2 (n = 35), por indivíduos saudáveis; e Grupo 3 (n = 35), por indivíduos que apresentavam outras parasitoses. Os resultados revelaram um desempenho diagnóstico de 93,2 % de sensibilidade e 94,3 % de especificidade para detecção de imunocomplexos em soros humanos com NCC confirmada. Os anticorpos IgY específicos produzidos a partir da imunização de galinhas com antígenos de FhTc apresentaram alto rendimento e reconhecimento antigênico, sendo capazes de detectar imunocomplexos em soros humanos. A aplicação inédita de anticorpos IgY específicos anti-FhTc no presente estudo mostrou-se eficiente no imunodiagnóstico da NCC.

Palavras-chave: anticorpo IgY, neurocisticercose, *Taenia crassiceps*, antígeno hidrofóbico, imunodiagnóstico.

**IgY technology applied in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis using
Taenia crassiceps fraction obtained by hydrophobicity**

ABSTRACT

Human neurocysticercosis (NCC) is a worldwide neglected disease caused by the metacestode of *Taenia solium* and responsible for various complications and neurological disorders. The aim of this study was to use specific IgY antibodies produced by laying hens immunized with hydrophobic fraction of *Taenia crassiceps* metacestodes (hFTc), for application in immunodiagnosis of human NCC. Antibodies obtained from chicken egg yolk were fractionated, purified and evaluated for potential production and antigen recognition (anti-hFTc). Indirect ELISA and Western blotting assays were carried out to evaluate the kinetics of production and avidity of maturation of IgY antibodies anti-hFTc throughout the experimental activity. The purified and specific IgY antibodies anti-hFTc were applied in an indirect immunofluorescence assay for detection of parasitic antigens in histological sections of *T. crassiceps* metacestodes. Sandwich ELISA assays were performed to detect circulating immune complexes formed by IgG and parasitic antigens in human sera. A total of 114 serum samples were analyzed and divided into three groups: Group 1 (n = 44), composed by individuals with confirmed NCC and subdivided into active NCC (n = 22) and inactive NCC (n = 22); Group 2 (n = 35), by healthy individuals for NCC; and Group 3 (n = 35), by individuals who presented other parasitic diseases based on parasitological exams. The results revealed a diagnostic performance of 93.2 % sensitivity and 94.3 % specificity for detection of immunocomplexes in human sera with confirmed NCC. In conclusion, specific IgY antibodies produced from immunization of hens with hFTc antigens were able to detect *T. solium* immune complexes in human sera, being an efficient tool for NCC immunodiagnosis.

Key-words: IgY antibody, neurocysticercosis, *Taenia crassiceps*, hydrophobic antigen, immunodiagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Taxonomia e descrição morfofisiológica de *Taenia solium*

Os helmintos são representados por diversas espécies, as quais podem desenvolver um ciclo de vida livre ou parasitário. Os representantes deste grupo são distribuídos nos filos Platyhelminthes, Nematoda e Acanthocephala. O filo Platyhelminthes é constituído por organismos protostômios (animais cuja boca é formada anteriormente ao ânus no desenvolvimento embrionário) acelomados e bilateralmente simétricos. Os platelmintos agrupam-se em quatro classes: Turbellaria, Trematoda, Monogenea e Cestoda. As três últimas estão inclusas no subfilo Neodermata, que engloba os platelmintos parasitos. A classe Cestoda é formada por endoparasitos hermafroditas desprovidos de epiderme, cavidade geral e sistema digestivo. O corpo é geralmente alongado e construído por segmentos. Um cestóide típico apresenta três regiões morfológicamente distintas, um escólex, que detém as estruturas de fixação, o colo ou pescoço, que suporta o escólex e se liga à terceira região, que é o estróbilo, segmentado nas formas polizoicas. Os cestódeos dividem-se em duas ordens, Cyclophyllidea e Diphyllbothridea. A ordem Cyclophyllidea abrange as espécies mais importantes para a parasitologia humana, incluindo as pertencentes à família Taeniidae, que são representadas pelos parasitos dos gêneros *Echinococcus* e *Taenia* (MELO; PINTO, 2016).

As tênias que possuem maior importância médico-parasitológica, são representadas pelas espécies *Taenia solium* e *Taenia saginata*, que têm como hospedeiros definitivos, os seres humanos. Ambas as espécies adultas possuem características morfofisiológicas intrínsecas. O sistema nervoso é constituído por gânglios na base do escólex e dos nervos laterais, interligados por comissuras. O sistema excretor é do tipo protonefridial, com células flama e canais excretores que percorrem as laterais do corpo do parasito e se interligam no último segmento, na parte posterior da proglote, formando a vesícula excretora e o poro excretor. O lúmen destes canais excretores é composto por corpúsculos calcários que são amplamente distribuídos em formas larvais e adultas dos cestódeos (VARGAS-PARADA et al., 1999). De acordo com Flores-Bautista et al. (2018) estas estruturas são depósitos minerais de sais de fosfato sobre uma matriz orgânica de proteínas, polissacarídeos e lipídios, envolvidos na coleta de metabólitos tóxicos e outros materiais, desenvolvendo um importante papel fisiológico. O aparelho genital masculino apresenta dezenas de testículos, com canais eferentes que se unem e formam o canal deferente. Os órgãos femininos são compostos por um ovário, com dois lobos

medianamente interligados, um oviduto, oriundo do ovário e um útero que tem origem no oótipo e termina em fundo de saco. Os ovos são esféricos e morfologicamente indistinguíveis entre as espécies de *Taenia*. Externamente, constituem-se por uma casca protetora ou embrióforo, que é formada por blocos piramidais de quitina. Internamente, possuem um embrião hexacanto ou oncosfera, com três pares de acúleos e dupla membrana. A forma metacestódea de *T. solium* é constituída de uma vesícula translúcida com líquido claro, contendo invaginado em seu interior um escólex com quatro ventosas, rostro e colo. A parede da vesícula do cisticercos é composta por três membranas, cuticular ou externa, celular ou intermediária e reticular (MELO; PINTO, 2016; SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

Existem quatro estágios de desenvolvimento das formas metacestódeas, os quais são derivados de modificações anatômicas e fisiológicas bem definidas. O primeiro estágio é conhecido como vesicular ou viável, no qual uma membrana se desenvolve ao redor da oncosfera, formando uma vesícula que contém líquido claro que envolve o escólex. No segundo estágio, conhecido como coloidal, o escólex apresenta sinais de degeneração alcalina e o líquido vesicular aparece turvo. Em seguida, o líquido vesicular torna-se mais opaco e o metacestódeo inicia a calcificação, determinando o terceiro estágio, o granular. Em seu último estágio, o metacestódeo apresenta-se calcificado e de tamanho reduzido, sendo conhecido como granular calcificado ou não viável (CORAL-ALMEIDA et al, 2015; SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

1.2. Vias de transmissão e ciclo biológico do complexo teníase-cisticercose

O complexo teníase-cisticercose é uma doença zoonótica negligenciada causada pela ingestão da forma metacestódea e de ovos de *T. solium*, respectivamente. A cisticercose humana ocorre quando ovos de *T. solium* são acidentalmente ingeridos e desenvolvem sua fase larval em diferentes tecidos (CDC, 2019; WHO, 2019).

O ciclo de vida de *T. solium* é complexo e atinge tanto suínos como seres humanos. Os humanos são os únicos hospedeiros definitivos, onde o parasito pode completar o seu ciclo de vida e existir na forma adulta, causando a teníase. Entretanto, humanos e suínos foram documentados como hospedeiros intermediários, nos quais os ovos de *T. solium* podem se desenvolver ao estágio metacestódeo (CORAL-ALMEIDA et al., 2015; GRIPPER; WELBURN, 2017; SAMOREK-PIERÓG; KARAMON; CENCEK, 2018).

Três mecanismos de infecção humana para estabelecimento do complexo teníase-cisticercose são conhecidos, a autoinfecção externa, autoinfecção interna e a

heteroinfecção. Na autoinfecção externa, os portadores de *T. solium* eliminam proglotes e ovos que podem ser levados à boca, pelas mãos contaminadas ou pela coprofagia. Na autoinfecção interna, os ovos e proglotes grávidas de *T. solium* encontram-se presentes no estômago, devido a vômitos e movimentos retroperistálticos do intestino. A ação do suco gástrico ativa as oncosferas, que retornam ao intestino delgado e desenvolvem o ciclo autoinfectante. Na heteroinfecção, os humanos ingerem alimentos contaminados com os ovos de *T. solium* disseminados no ambiente pelos dejetos de outro indivíduo (SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

Uma vez que os ovos são ingeridos, as oncosferas eclodem no intestino, invadem a parede intestinal, e migram para os músculos estriados, bem como o cérebro e outros tecidos, onde se desenvolvem em formas metacestódeas. Em humanos, as formas larvais podem causar sequelas graves quando localizadas no cérebro, resultando em neurocisticercose (NCC), uma doença parasitária grave do sistema nervoso central (SNC) causada por *T. solium*. O ciclo de vida do parasito é concluído quando os seres humanos ingerem carne suína malcozida contendo metacestódeos. Os metacestódeos fixam-se ao intestino delgado pelo seu escólex e se desenvolvem em formas adultas, de dois a oito metros em comprimento e produzem cerca de 1.000 proglotes com aproximadamente 50.000 ovos cada (SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; CDC, 2019).

1.3. Aspectos epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose

A teníase e a cisticercose são consideradas doenças negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2019). Os problemas públicos de saúde, em termos de morbidade e mortalidade, gerados pelo complexo teníase-cisticercose são recorrentes em áreas de baixo nível socioeconômico e saneamento básico precário, principalmente em países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina (CARPIO et al., 2018).

De acordo com a OMS, a intensificação mundial no consumo de carne tem gerado aumento no número de casos de cisticercose em áreas não endêmicas, bem como reduzido o valor de mercado de suínos e bovinos. Em 2015, o Grupo de Referência em Epidemiologia de Doenças transmitidas pelos Alimentos da OMS, identificou *T. solium* como a principal causa de morte por doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2019). A doença é endêmica especialmente em áreas rurais que desenvolvem sistemas extensivos de criação de suínos em contato direto com os seres humanos (TELLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-RONQUILLO, 2017).

A distribuição mundial do complexo teníase-cisticercose é considerada cosmopolita, com restrição às áreas cujas populações possuem hábitos culturais de se alimentarem de carnes cruas ou malcozidas, que não são inspecionadas por agências de vigilância sanitária. Segundo Torgerson et al. (2015), a cisticercose humana foi responsável por cerca de 50.000 mortes em 1990 e a NCC foi causa de 28.114 mortes em 2010, de acordo com estimativas epidemiológicas da OMS.

No Brasil, a escassez de dados sobre a ocorrência da cisticercose animal não permite traçar um perfil epidemiológico concreto da doença. As indicações de áreas endêmicas se restringem às estatísticas dos matadouros, provenientes de inspeções sanitárias (SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; WHO, 2019). A maioria dos casos relatados de cisticercose no Brasil é oriunda das regiões Sudeste e Sul, principalmente dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002). A compreensão dos perfis epidemiológicos do complexo teníase-cisticercose permite traçar informações fundamentais relacionadas à transmissão e, conseqüentemente, potencializar medidas de controle sanitário eficientes (CORAL-ALMEIDA et al., 2015).

Em estudo conduzido por Martins-Melo et al. (2016), os estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste (exceto Rio de Janeiro) e Paraná, apresentaram os mais altos índices de mortalidade relacionados à NCC no Brasil, no período de 2000-2011, sendo a taxa de mortalidade geral ajustada por idade de 0,97 óbitos por 1 milhão de habitantes. As maiores taxas anuais de mortalidade ajustadas por idade por estado foram observadas no Paraná (2,38), Minas Gerais (1,64) e Goiás (1,59) (óbitos / 1.000.000 de habitantes). Estudos de soroprevalência realizados em cidades do Estado de Minas Gerais (SILVEIRA-LACERDA et al., 2002) confirmaram endemicidade da cisticercose, sendo a cidade de Araguari, a de maior índice, 13,5 %. Em estudo mais recente, realizado em Goiás, na cidade de Jataí, foi comprovada soroprevalência de 13,8 % (GUARDA; COSTA-CRUZ; BARCELOS, 2018).

A NCC é uma doença endêmica de áreas que apresentam clima quente e cujas precárias condições de vida e socioeconômicas das populações favorecem seu desenvolvimento (DEL BRUTTO, 2012).

O número mundial de pessoas que sofrem de NCC, incluindo casos sintomáticos e assintomáticos, está estimado entre 2,56 - 8,30 milhões, com base nos dados de prevalência de epilepsia disponíveis (WHO, 2019). A doença é responsável pela maioria dos casos de epilepsia em todo o mundo, atingindo cerca de 30 % das pessoas sintomáticas em áreas endêmicas. Embora a limitação de dados para avaliação precisa da distribuição

da NCC tenha dificultado a previsão das principais vias de transmissão, estratégias aprimoradas de controle do complexo teníase-cisticercose têm sido implantadas pela OMS (GRIPPER; WELBURN, 2017; WHO, 2019).

1.4. Relação parasito-hospedeiro e resposta imunológica na neurocisticercose

O conhecimento atual das relações parasito-hospedeiro na NCC, permitiu compreender que a utilização de modelos animais para o entendimento da imunopatologia da doença, bem como para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, é inviável. Em vista de se aproximar o máximo das condições clínicas e patológicas da NCC, é necessária a existência de um modelo animal que mimetize a doença, uma vez que a NCC causa epilepsia somente em seres humanos. Nesse sentido, como a infecção natural desses modelos por *T. solium* não mimetiza a doença humana, a utilização de *Taenia crassiceps* para infecção de camundongos e ratos tem aumentado (ARORA et al., 2017).

De acordo com Minciullo et al. (2016), infecções por helmintos são caracterizadas por níveis elevados de Imunoglobulina E (IgE), assim como ativação e proliferação de eosinófilos e mastócitos teciduais. A produção de citocinas, como as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 por linfócitos T CD4⁺ também é característica da defesa contra helmintos.

Antígenos de metacestódeos vesiculares induzem o aumento da concentração de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE no soro de pacientes com NCC. As formas clínicas mais graves da doença, como hidrocefalia, vasculite, infarto cerebral e múltiplos granulomas, têm sido relacionadas com elevados níveis de anticorpos, com predominância de IgM específico no líquido cefalorraquidiano (LCR) (SILVA; TAKAYANAGUI, 2016). Citocinas inflamatórias de IL-1 β , IL-5, IL-6 e TNF- α localmente produzidos pela micróglia ativada e linfócitos periféricos foram encontradas em LCR de indivíduos infectados (FLEURY et al., 2011).

Na resposta imunológica da NCC, sabe-se que existe relação direta entre os estágios morfofisiológicos das formas metacestódeas com as localizações do parasito no cérebro e as respostas inflamatórias contra os parasitos e seus antígenos liberados. O estágio coloidal está associado com maior reação inflamatória, o que pode ser notado em nível inicial de infecção e a nível radiológico, pela presença de edema (em locais parenquimatosos). Nas localizações extraparenquimatosas, a inflamação não é a causa dos sintomas iniciais, sendo estes relacionados ao efeito da presença do parasito (CARPIO et al., 2018). Por outro lado, tem sido sugerida imunossupressão em indivíduos com NCC,

resultante do aumento de subpopulações de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, proliferação prejudicada de linfócitos e concentração anormal de citocinas, condições que podem estar relacionadas à imunodeficiência ou à presença de gliomas cerebrais (DEL BRUTTO, 2012). A forma metacestódea de *Taenia* spp. possui ainda a capacidade de evadir da resposta imunológica do hospedeiro. Estudos demonstram que dois antígenos presentes no metacestódeo, a paramiosina e a taenistatina, são capazes de inibir as ações do componente C1q do complemento, bem como suas vias clássicas e alternativas, respectivamente (SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

1.5. Aspectos clínicos da neurocisticercose

As manifestações clínicas da NCC são diretamente dependentes do número, tamanho, localização das formas metacestódeas e da resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito. A convulsão é considerada a manifestação clínica mais comum da doença, podendo afetar cerca de 70 % dos pacientes (CARPIO et al., 2016).

A localização do metacestódeo pode ser considerada parenquimatosa quando este encontra-se alojado dentro de tecidos funcionais do cérebro, ou extra parenquimatosa, quando presente nas demais regiões do SNC (GRIPPER; WELBURN, 2017).

A NCC parenquimal ocorre quando as formas metacestódeas se aglomeram na região de intersecção da medula com o córtex cerebral. As manifestações sintomáticas mais frequentes nessa forma clínica são convulsões, ataques epilépticos e dores de cabeça intensas, entretanto, as convulsões são mais frequentes após a degeneração do metacestódeo, estando associadas à inflamação local do córtex (SINGHI; SUTHAR, 2015). Outra manifestação comum do parênquima cerebral é a hipertensão intracraniana, uma síndrome ocasionada por hidrocefalia ou pela encefalite, a qual ocorre principalmente em crianças e adolescentes e pode ou não estar associada às convulsões (FLEURY et al., 2011; DEL BRUTTO, 2012; SINGHI; SUTHAR, 2015).

Na NCC extraparenquimal, que ocorre em aproximadamente um terço dos pacientes (CARPIO et al., 2016), os metacestódeos estão localizados em várias partes do SNC. As principais formas de apresentação são hidrocefalia obstrutiva e aracnoidite crônica ou meningite. A obstrução do LCR é devida à alta carga de metacestódeos racemosos, que se formam por crescimento desproporcional com ramificações multilobulares no espaço subaracnóideo e nos ventrículos, gerando hidrocefalia e infartos cerebrais (BANSAL et al., 2014; SINGHI; SUTHAR, 2015), além de graves reações inflamatórias (CALLACONDO et al., 2012).

A presença de metacestódeos na medula espinhal é rara, porém, em casos de ocorrência, complicações como dor radicular, parestesia, distúrbios esfintéricos e paraplegia podem ser observadas. Manifestações intraoculares também são comuns na NCC, atingindo a câmara subconjuntival, o espaço sub-retiniano e o humor vítreo (DEL BRUTTO, 2012; SINGHI; SUTHAR, 2015). Miastenia generalizada, devido a infecção de músculos estriados, pode estar associada à pseudo-hipertrofia muscular (CARPIO et al., 2016).

1.6. Critérios diagnósticos da neurocisticercose

Os primeiros critérios diagnósticos da NCC humana foram estabelecidos por Del Brutto et al. (1996). A criação desses critérios adveio da necessidade de elaboração de técnicas imunológicas e de neuroimagem mais sensíveis e específicas para a NCC em áreas endêmicas, com o objetivo de aumentar a precisão do diagnóstico. Estes critérios foram divididos em quatro categorias de dados, absoluta, majoritária, minoritária e epidemiológica, que se baseiam em três graus de diagnóstico: definitivo, provável e possível. Em 2001, Del Brutto e colaboradores atualizaram os graus de certeza, retirando a última categoria (possível) das avaliações, em virtude de sua confiabilidade.

Em 2012, os critérios foram novamente atualizados. O absoluto incluía a demonstração do parasito em amostras histológicas de biópsias da medula ou do cérebro, na visualização de formas metacestódeas com escólex por meio de exames de tomografia computadorizada (TC) e imagem por ressonância magnética (RM) e em exames oftalmológicos sub-retinais. O critério majoritário estabelecia a detecção de lesões em estudos de neuroimagem; *blot* de imunoeletrotransferência enzimática (EITB) de soro positivo, para detecção de anticorpos anti-metacestódeos e a resolução de pequenas lesões de maneira espontânea e lesões intracranianas após terapia com albendazol ou praziquantel. O critério minoritário demonstrava a similaridade de lesões cerebrais por meio da neuroimagem e de suas manifestações clínicas com aquelas próprias da NCC; positividade do ensaio *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) para anticorpos ou antígenos de metacestódeos e a presença de formas metacestódeas fora do SNC. O critério epidemiológico evidenciava a infecção por *T. solium* de indivíduos emigrantes ou habitantes de áreas endêmicas para a cisticercose (DEL BRUTTO, 2012).

Em 2017, Del Brutto e colaboradores publicaram uma nova atualização dos critérios, com o objetivo de simplificar e operacionalizar suas definições e torná-los mundialmente aplicáveis. O critério absoluto permaneceu inalterado na nova revisão. As

demais categorias, divididas em critério de neuroimagem e critério clínico ou de exposição foram modificadas com base em dois princípios, a essencialidade dos exames de imagem e a pouca efetividade das manifestações clínicas, testes imunodiagnósticos e dados epidemiológicos ao diagnóstico da NCC.

O critério de neuroimagem foi dividido em critério de neuroimagem majoritário, confirmativo e minoritário. O majoritário inclui lesões metacestódeas sem um escólex discernível, lesões realçadas, lesões metacestódeas multilobuladas no espaço subaracnóideo e calcificações parenquimais típicas. A presença de duas lesões eleva a probabilidade de um diagnóstico definitivo de NCC em um determinado paciente; o critério confirmativo inclui a resolução de lesões após terapia medicamentosa, a resolução espontânea de pequenas lesões de realce e a migração de metacestódeos ventriculares documentados em estudos de neuroimagem sequencial; e o critério minoritário inclui hidrocefalia obstrutiva (simétrica ou assimétrica) ou realce anormal das leptomeninges basais. A segunda categoria, formada pelo critério clínico ou de exposição foi dividida em clínico majoritário e minoritário. O critério clínico majoritário compreende a detecção de anticorpos específicos anti-metacestódeos ou antígenos de metacestódeos por meio de testes imunodiagnósticos bem padronizados, cisticercose fora do SNC e evidência de contato domiciliar com infecção por *T. solium*. O critério clínico minoritário inclui manifestações clínicas sugestivas de NCC e indivíduos provenientes ou viventes de áreas onde a cisticercose é endêmica. Para interpretação desses critérios, são necessários dois graus de certeza de diagnóstico. O diagnóstico definitivo é definido por: um critério absoluto; dois de neuroimagem majoritários, além de quaisquer critérios clínicos; um de neuroimagem majoritário e um de confirmação, mais qualquer critério clínico; e um dos critérios de neuroimagem majoritário mais dois clínicos (incluindo pelo menos um clínico majoritário), juntamente com a exclusão de outras doenças que produzam achados de neuroimagem semelhantes. O diagnóstico provável é definido por: um dos critérios majoritários de neuroimagem mais dois clínicos ou um de neuroimagem minoritário, além de pelo menos um dos critérios clínicos majoritários (DEL BRUTTO et al., 2017).

1.6.1 Diagnóstico por neuroimagem e sorologia

Os critérios de neuroimagem são importantes para alcançar um diagnóstico definitivo da NCC (DEL BRUTTO et al., 1996). Os exames de TC e RM evidenciam o número e a magnitude das lesões, bem como aspectos morfológicos das formas

metacestódeas, seus locais de inserção, quantidade, seus níveis de desenvolvimento e a presença de inflamação circundante. Porém, o estágio degenerativo da forma metacestódea vesicular dificulta o diagnóstico por TC e RM, tornando necessária a utilização de imagens ponderadas em difusão (DWI) e imagens rápidas que empregam aquisição de estado estacionário (FIESTA) para a visualização do escólex em metacestódeos coloidais, visto que estas novas técnicas aumentam a precisão diagnóstica da RM, pois permitem o reconhecimento do escólex em casos que não são visualizados pelos métodos convencionais (DEL BRUTTO, 2012; DEL BRUTTO, 2014; GARCIA; NASH; DEL BRUTTO; 2014; DEL BRUTTO et al., 2017).

Enquanto DWI e FIESTA aumentam a capacidade da RM para reconhecer a mineralização, a TC é o método de escolha para visualização da forma metacestódea calcificada e para a quantificação de lesões. Em comparação com a TC, a RM é mais efetiva para a visualização dos metacestódeos na medula espinhal ou espaço subaracnóideo da coluna vertebral e para a detecção de lesões intraventriculares, na fossa posterior e no tronco encefálico, uma vez que as lesões são vistas em maiores definições (GARCIA; NASH; DEL BRUTTO; 2014; SINGHI; SUTHAR, 2015).

Dentre os métodos sorológicos para o diagnóstico da NCC, o mais confiável e considerado padrão-ouro é o EITB, em virtude de sua alta sensibilidade (97 %) e especificidade (100 %) e da capacidade de detectar anticorpos específicos, provenientes de amostras de soro ou do LCR, para os antígenos de *T. solium*. A utilização do teste imunológico, permite o diagnóstico preciso da NCC detectada em exames de imagens inconclusivos. A eficiência do teste EITB, entretanto, é questionada. Algumas limitações, como a presença de formas metacestódeas intracranianas únicas ou formas calcificadas encontradas no SNC, diminuem a sensibilidade de detecção, amplificando o número de casos falso-negativos. Além disso, o teste pode apresentar positividade em pacientes com a forma adulta do parasito e que não desenvolveram a NCC. Testes ELISA para detecção de antígenos ou anticorpos têm sido utilizados, porém, apresentam sensibilidade e especificidade variadas. Outro teste que tem sido utilizado é o ELISA baseado em anticorpos monoclonais. Embora sua sensibilidade ainda não tenha sido bem detalhada em pacientes com NCC, o teste possui a vantagem de não apresentar reações cruzadas com outros helmintos (DEL BRUTTO, 2012; GARCIA; NASH; DEL BRUTTO, 2014; SINGHI; SUTHAR, 2015; DEL BRUTTO et al., 2017).

1.7. *Taenia crassiceps* e a viabilidade do antígeno heterólogo no imunodiagnóstico da neurocisticercose

Taenia crassiceps foi primeiramente descrita por Zeder no ano de 1800. O parasito é um cestódeo comum de raposas vermelhas (*Vulpes vulpes L.*) provenientes da Europa. Sua forma metacestódea, *Cysticercus longicollis*, descrita por Rudolphi em 1819, foi relatada em pequenos roedores e toupeiras no continente europeu. O verme adulto de *T. crassiceps* mede de 0,7 a 1,4 cm de comprimento e cerca de 0,24 cm de largura. As formas metacestódeas variam seu tamanho de acordo com sua fase de desenvolvimento, podendo alcançar 0,11 cm de comprimento por 0,06 cm de largura. A cepa original (ORF) de *T. crassiceps* utilizada para inoculações em camundongos, foi obtida de uma raposa em novembro de 1952 (FREEMAN, 1962).

O antígeno heterólogo da forma metacestódea de *T. crassiceps* foi obtido após testes ELISA indireto por Larralde et al. (1990), com a função de substituir os antígenos de *T. solium* no imunodiagnóstico da cisticercose humana. A partir dessa pesquisa, o fornecimento de antígenos para padronização de testes imunodiagnósticos e aplicações epidemiológicas foi estabelecido (BIONDI et al., 1996).

A busca por antígenos alternativos para o imunodiagnóstico da NCC faz-se necessária para o conhecimento de casos isolados da doença em países não endêmicos e em regiões onde a coleta de metacestódeos de *T. solium* é laboriosa (FLEURY et al., 2003).

O fluido vesicular de *T. crassiceps* foi purificado utilizando soro de coelho imunizado com *T. solium*, na Alemanha, em 1989. A sensibilidade desse novo antígeno heterólogo purificado foi comparada à do antígeno homólogo obtido do fluido vesicular de *T. solium*. No ano seguinte, em 1990, este antígeno começou a ser utilizado no Brasil. Enquanto alguns estudos que comparam antígenos homólogos e heterólogos reportam maior sensibilidade para o antígeno heterólogo, tanto para amostras de soro como para amostras de LCR, outros encontraram maior sensibilidade e especificidade para o extrato antigênico homólogo (BUENO et al., 2000; BARCELOS et al., 2001; TOGORO; SOUZA; SATO, 2012).

A facilidade de manutenção de metacestódeos de *T. crassiceps* em animais de laboratório, somada à alta capacidade de multiplicação no peritônio de camundongos por reprodução assexuada, permite ampla utilização para a produção de antígenos heterólogos para o imunodiagnóstico da NCC humana (WILLMS; ZURUBIAN, 2010).

A forma metacestódea da cepa ORF de *T. crassiceps* também tem sido estudada para a compreensão da resposta imune de seus hospedeiros, bem como para o desenvolvimento de novas vacinas, embora conhecimentos moleculares desse parasito ainda sejam escassos na literatura. Outras vantagens no uso de formas metacestódeas de *T. crassiceps* são a capacidade de infecção rara em seres humanos, a alta reatividade cruzada de seus anticorpos com antígenos de metacestódeos de *T. solium* (WILLMS; ZURUBIAN, 2010; GARCÍA-MONTOYA et al., 2016).

1.8. Utilização de frações antigênicas no imunodiagnóstico da neurocisticercose

A escolha de um antígeno adequado para o imunodiagnóstico da NCC humana é essencial para a obtenção de resultados de alta sensibilidade e especificidade. ELISA e EITB têm sido os métodos diagnósticos de escolha para a detecção de anticorpos de LCR e soro e de antígenos de *T. solium*, provenientes de extratos alcalinos, salinos e de membrana das formas metacestódeas, assim como do fluido vesicular (SHIGUEKAWA et al. 2000; ISHIDA et al. 2006).

Para a preparação de frações antigênicas em laboratório, o detergente Triton X-114 (TX-114), tem sido utilizado para a separação das fases detergente (D) e aquosa (A) dos extratos antigênicos totais (MACHADO et al., 2007). Segundo Bordier (1981), as proteínas de membrana integral de natureza anfifílica são recuperadas na fase D e as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fase A. A eficiência da separação aumenta com a temperatura e é sensível à presença de outros surfactantes.

Alguns trabalhos, como o de Ribeiro et al. (2010b), utilizaram a mesma solução detergente na preparação de frações antigênicas do extrato salino total de *T. saginata* para detecção de IgA e IgG em amostras de soro humano de indivíduos com NCC. Porém, neste estudo, foram utilizadas frações ligantes à jacalina (JBF) e não ligantes à jacalina (JUF) obtidas por cromatografia de afinidade, como fontes antigênicas alternativas. Em seus resultados, observaram que as frações antigênicas D e JBF são mais eficientes e específicas para a detecção de anticorpos IgA em indivíduos com NCC, quando comparadas com IgG. Esses resultados reiteram que *T. saginata* compartilha determinantes antigênicos com *T. solium* (MACHADO et al., 2007; MACHADO et al., 2013), e, conseqüentemente, com *T. crassiceps* (SILVA et al., 2017), corroborando a aplicabilidade deste último no imunodiagnóstico da NCC. Estudos como o de Silva et al. (2017), utilizaram o detergente TX-114 para obtenção de frações hidrofóbicas A e D a partir de fluidos vesiculares de metacestódeos de *T. crassiceps*, que foram testadas em

amostras de LCR humano. Em seus resultados, concluíram que ambas as frações, A e D, podem ser utilizadas como fontes antigênicas específicas e são eficientes para o imunodiagnóstico da NCC humana ativa e inativa, quando comparadas com frações obtidas a partir de *T. solium* (MACHADO et al., 2007; MACHADO et al., 2013).

1.9. Aplicação dos anticorpos IgY

Os anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas, podem ser encontrados no sangue e em fluidos teciduais. Dentre suas principais funções, essas moléculas glicoproteicas agem na resposta imune específica combatendo infecções por meio de três vias, a neutralização, opsonização e ativação do complemento (JANEWAY; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001; LEE et al., 2017).

Apesar de serem estruturalmente semelhantes, os anticorpos de mamíferos e aves divergem em suas propriedades bioquímicas e funcionais. As imunoglobulinas IgA, IgM e IgY são as únicas que podem ser encontradas em aves. A IgY é a mais abundante, especialmente nas gemas dos ovos, sendo a única que pode ser comparada estrutural e funcionalmente com os isotipos IgG e IgE de mamíferos. As principais diferenças estruturais entre IgG e IgY são observadas nas regiões constantes (Fc) dos anticorpos. A região CH2 de *hing* da IgY é menos flexível que a de IgG de mamíferos, sendo, neste aspecto, comparável à IgE. Por possuir uma região CH4 adicional, a IgY possui um peso molecular (~180 kDa) superior à IgG (~150 kDa). Com relação às diferenças bioquímicas e funcionais, o domínio Fc de IgY apresenta um papel imunomodulatório, quando comparado ao da IgG, que ativa o sistema complemento. Além disso, a afinidade da IgY com seu receptor Fc *Gallus gallus* (ggFcR) é maior em comparação à de IgG com seu receptor (Fc-FcγR) (VIERTLBOECK et al., 2007; ARNON et al., 2008; VIERTLBOECK et al., 2009; TAYLOR et al., 2010; MULLER et al., 2015; LEE et al., 2017).

Segundo Lee et al. (2017), a utilização de modelos animais com o objetivo de caracterizar e compreender a funcionalidade de anticorpos em vista de aprimorar as técnicas imunodiagnósticas e terapêuticas tem aumentado. Além disso, a escolha de um modelo animal para a geração de anticorpos depende de vários fatores, como da conservação antigênica entre as diferentes espécies, dos tipos de clones (mono ou policlonais) e do número de anticorpos a serem produzidos. Embora os mamíferos sejam o grupo de animais que possuem o maior número de aplicações para a geração de anticorpos, as aves, em particular as galinhas, têm sido utilizadas para a produção e caracterização de imunoglobulinas, devido a diversos fatores, como: (1) a transferência

materna direta de anticorpos para a gema dos ovos de galinhas, o que confere um elevado grau de pureza às imunoglobulinas isoladas, uma vez que existe maior número de anticorpos no soro; (2) a rentabilidade promovida pela capacidade de postura diária das galinhas, que geram uma grande quantidade de anticorpos via gema em um mês, enquanto um coelho produz a mesma quantidade no soro, em um ano; (3) o baixo custo em comparação à produção de anticorpos monoclonais (BRAMBELL, 1970; SVENDSEN et al., 1995; BOLLEN; HAU, 1996; MINE; KOVACS-NOLAN, 2002; KOUSTED et al., 2017; LEE et al., 2017).

A imunização é o método mais convencional para a geração de anticorpos IgY em galinhas. Durante a aplicação do antígeno, o mesmo deve ser suspenso em adjuvantes, com o objetivo de prolongar a durabilidade do antígeno e eliciar a resposta imunológica no hospedeiro (BILLIAU; MATTHYS, 2001; MAQUIEIRA et al., 2012; GUVEN et al., 2013; LEE et al., 2017). Outra técnica de administração de antígeno em galinhas é a aplicação via aerossóis (MARCQ et al., 2013).

Trabalhos recentes têm utilizado a técnica de imunização com diferentes variedades de antígenos derivados de bactérias, vírus, protozoários, fungos, helmintos e répteis, para a geração de anticorpo policlonal (IgY) em galinhas, e aplicado esses anticorpos em novas técnicas imunodiagnósticas e biotecnológicas (MANHANI et al., 2011; FERREIRA Jr. et al., 2012; GRZYWA et al., 2014; KIM et al., 2017; PERALTA et al., 2017; ROCHA et al., 2017; XING et al., 2017; BORGES, et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste estudo foi produzir, caracterizar, purificar e aplicar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas inoculadas com antígenos da fração hidrofóbica de metacestódeos de *T. crassiceps* (FhTc) no imunodiagnóstico da NCC humana.

2.2. Específicos

- Fracionar e purificar anticorpos IgY policlonais provenientes da gema de ovos de galinhas imunizadas com antígenos de FhTc;
- Realizar imunoenaios ELISA e *Western blotting* para caracterização dos anticorpos IgY anti-FhTc quanto à cinética de produção, especificidade, e maturação da avidéz;
- Avaliar os anticorpos IgY anti-FhTc quanto ao reconhecimento antigênico de cortes histológicos de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps* por reação de imunofluorescência indireta (RIFI);
- Aplicar os anticorpos IgY purificados anti-FhTc na detecção de imunocomplexos em soros de indivíduos com NCC confirmada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

O estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), ambos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e no Hospital Veterinário de Uberaba, em parceria com a Universidade de Uberaba (UNIUBE), sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) (Protocolo Nº 094/16), e do Comitê de Ética em Pesquisa Humana (CEP) (CAAE: 65800116.4.0000.5152/ Nº 2.088.856).

A cepa de *T. crassiceps* foi mantida em camundongos fêmea da linhagem BALB/c no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais/UFU (CEP/UFU) - protocolo de Nº 096/14. As galinhas foram imunizadas e mantidas sob responsabilidade do Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior, Médico Veterinário (CRMV-MG 4325), no Laboratório de Experimentação Veterinária do Instituto de Estudos Avançados em Veterinária José Caetano Borges da UNIUBE em Uberaba-MG.

As amostras de soro utilizadas neste estudo encontram-se disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses da UFU, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz. A manutenção destes espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFU (CEP/UFU) sob protocolo de Nº 041/2008. As amostras de soro foram coletadas após exame parasitológico de três amostras de fezes de cada indivíduo.

3.2. Amostras de soros

Foram utilizadas 114 amostras de soros de indivíduos divididas em três grupos:

Grupo 1 (n = 44) - amostras de soro de indivíduos com diagnóstico confirmado para NCC por meio de dados clínicos, epidemiológicos, sorológicos e neuroimagem. Essas amostras foram selecionadas com base nas diretrizes diagnósticas da NCC propostas por Del Brutto et al. (2012) e subdivididas em NCC ativa (n = 22) e inativa (n = 22);

Grupo 2 (n = 35) - amostras de soro de indivíduos negativos para NCC com base no estado clínico e exames parasitológicos negativos de três amostras fecais por Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES, 1948) e Lutz (LUTZ, 1919).

Grupo 3 (n = 35) - amostras de soro de indivíduos com outras parasitoses, como: ancilostomatídeos (n = 4), *Ascaris lumbricoides* (n = 3), *Echinococcus granulosus* (n = 5), *Entamoeba histolytica/dispar* (n = 1), *Enterobius vermicularis* (n = 4), *Giardia lamblia* (n = 3), *Hymenolepis nana* (n = 4), *Schistosoma mansoni* (n = 3), *Strongyloides stercoralis* (n = 2), *Taenia* spp. (n = 3), *Trichuris trichiura* (n = 1), e coinfeções (n = 2): *Entamoeba histolytica/dispar* + *Giardia lamblia* e ancilostomatídeo + *Ascaris lumbricoides*. Amostras desse grupo foram obtidas de indivíduos que foram submetidos a exames parasitológicos de fezes realizados com três amostras de cada indivíduo, de acordo com Ritchie (1948).

3.3. Obtenção de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

Fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) foram infectadas experimentalmente com metacestódeos de *T. crassiceps* (cepa ORF) no CBEA da UFU, Minas Gerais, Brasil.

Os metacestódeos foram obtidos da cavidade abdominal dos animais, após eutanásia utilizando overdose de anestésicos (cloridrato de ketamina 10 % e cloridrato de xilazina 2 %), após três meses de infecção, tempo necessário para reprodução do parasito, e armazenados em PBS (*phosphate-buffered saline*), à -20 °C.

3.4. Galinhas

Quatro galinhas de postura *Gallus gallus domesticus* da linhagem *Isa Brown*, com 25 semanas de idade foram utilizadas para a produção de anticorpos IgY policlonais. As galinhas foram mantidas individualmente em gaiolas de arame suspensas com água e ração *ad libitum* e divididas em dois grupos de acordo com as imunizações:

- **Grupo I** – duas galinhas imunizadas com antígenos da fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (FhTc);
- **Grupo II** – duas galinhas imunizadas com tampão fosfato-salino (PBS).

3.5. Produção do extrato salino total de metacestódeos de *Taenia crassiceps*

Um total de 300 metacestódeos de *T. crassiceps* foram utilizados. Os metacestódeos foram ressuspensos em 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 mol/L, pH 7,2) com a adição de inibidores de protease (mini-MLTRACompleta, Roche, Mannheim, Alemanha) e rompidos em cinco ciclos de maceração, com a utilização de nitrogênio líquido. Após os ciclos de maceração, a suspensão foi centrifugada a 3.000 x g por 2 h a 4° C. O sobrenadante foi colhido e a dosagem proteica realizada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão de referência a soroalbumina bovina (BSA) a 0,2 %.

3.6. Fracionamento do extrato salino total de metacestódeos de *Taenia crassiceps* com Triton X-114 para obtenção da fração hidrofóbica

A fração hidrofóbica foi obtida a partir do extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps*, conforme descrito por Silva et al. (2017) com algumas modificações, utilizando Triton X-114 (TX-114). O processo de fracionamento, para cada lote, partiu de uma concentração proteica de 14.000 µg/mL do extrato salino total, obtido conforme descrito no item 3.5, seguindo cinco etapas (I-V):

I – Foram adicionados 2,8 mL de Tris (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl) e 38 µL de TX-114 1 % a 1 mL do extrato salino total. A solução foi homogeneizada e mantida em banho de gelo por 10 minutos;

II – Para separação das fases hidrofóbica e hidrofílica, foi adicionado um volume de 5.757 µL de sacarose 6 %, (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl e 0,06 % de TX-114), na proporção de 2:3, e incubado a 37 °C por 10 minutos;

III – A solução foi centrifugada durante 10 min a 3.000 x g a 4 °C.

IV – A fração hidrofílica foi descartada e a fração hidrofóbica armazenada no mesmo tubo.

V – A fração hidrofóbica foi precipitada em acetona PA na proporção de 1:2 (v/v), a 4 °C *overnight* e centrifugada a 3.000 x g, a 4 °C, por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de PBS.

A dosagem proteica da fração hidrofóbica foi realizada conforme item 3.5. As etapas de fracionamento antigênico foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12 %) sob condições não redutoras, de acordo com Silva et al. (2017).

3.7. Imunizações

As imunizações das galinhas para a produção de anticorpos IgY policlonais anti-FhTc foram realizadas de acordo com metodologia proposta por Schwarzkopf et al. (2001). Foram realizadas quatro imunizações via intramuscular na região peitoral em diferentes pontos, com intervalo de 14 dias cada. Na semana 1, as galinhas foram imunizadas com um volume total de 500 µL (250 µL de antígeno com massa de 100 µg diluídos em PBS + 250 µL de adjuvante completo de Freund). A partir da segunda semana, as imunizações foram realizadas da mesma forma, porém, com o adjuvante incompleto de Freund. Os animais do grupo controle foram imunizados seguindo o mesmo protocolo, exceto pela ausência dos antígenos parasitários. As aplicações foram realizadas conforme figura 1.

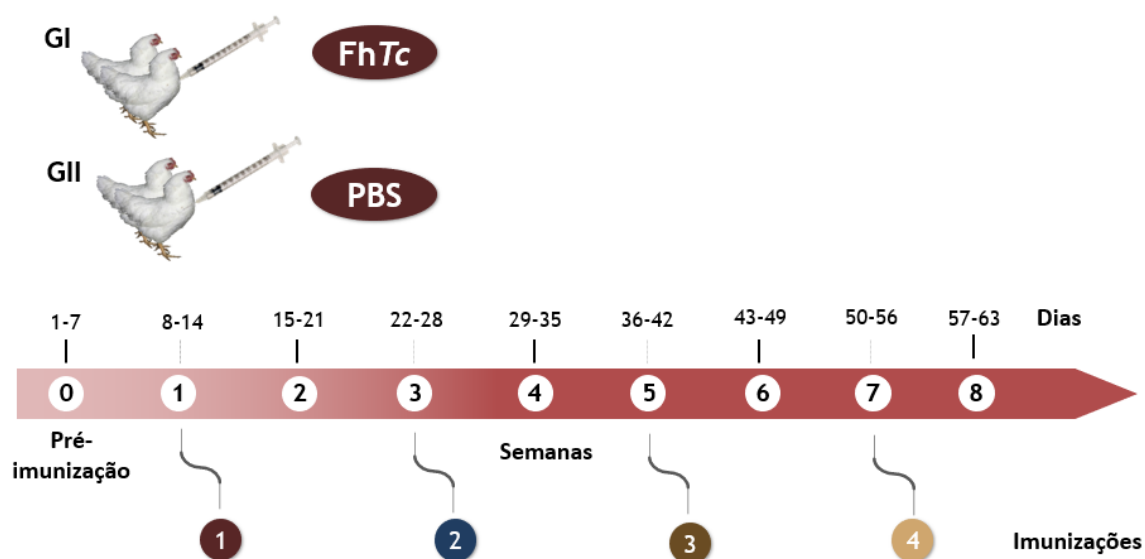


Figura 1. Esquema de imunização com fração hidrofóbica de metacestódeos de *T. crassiceps* (FhTc) (GI) e PBS (GII) em intervalos de 14 dias.

3.8. Coleta de sangue, ovos e armazenamento das gemas

A coleta de sangue e ovos iniciou-se na semana 0 (pré-imune) e prosseguiu até a última semana. As amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para prevenir a coagulação sanguínea, e armazenadas a -20 °C. Os ovos foram coletados, identificados de acordo com o grupo de imunização pertencente e armazenados a 4 °C de acordo com a semana de coleta até o uso. As cascas foram desinfetadas com etanol 70 % e as gemas separadas das claras. As gemas intactas foram lavadas abundantemente com água destilada (H₂O dd). Após secagem do excesso de H₂O dd, a membrana vitelínica foi rompida e o conteúdo mensurado e armazenado em tubos tipo Falcon (50 mL) a -20 °C. As gemas correspondentes às coletas semanais foram reunidas em um mesmo tubo, formando um *pool* semanal para análises posteriores.

3.9. Fracionamento dos anticorpos IgY provenientes da gema

O processo de fracionamento dos anticorpos IgY policlonais iniciou-se com a delipidação das gemas de acordo com o método descrito por Akita e Nakai (1993), com modificações. As gemas foram homogeneizadas com água destilada (pH 7,0) na proporção de 1:15. A solução foi mantida sob agitação constante à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 5,5 com tampão acetato 0,06 M (pH 4,8). A solução foi armazenada sob agitação constante a 4 °C *overnight*. Em seguida, a solução foi centrifugada a 800 x g por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido, filtrado em papel de filtro e o pH ajustado para 7,4 com NaOH (0,1 M). O precipitado lipídico foi armazenado a -20 °C. A precipitação dos anticorpos IgY foi realizada pela adição de sulfato de amônio 20 % (m/v) (Sigma Aldrich, EUA) ao sobrenadante, sob agitação lenta a 4 °C durante 45 minutos. A solução foi centrifugada a 2.000 x g por 20 min a 4 °C, o precipitado obtido foi ressuspenso em PBS (pH 7,4) na proporção 1:10 considerando o volume inicial da solução delipidada, dosado (Biodrop Ulite, Reino Unido) e armazenado a -20 °C até o uso.

3.10. ELISA indireto para verificação da cinética de produção da IgY

Testes ELISA indireto foram realizados para a determinação da cinética de produção dos anticorpos IgY anti-FhTc provenientes de gemas de ovos e amostras de soro. Microplacas de poliestireno, 96 poços, de baixa afinidade (Greiner, *BloOne*, Áustria) foram sensibilizadas com 50 µL de antígenos FhTc (10 µg) em tampão

carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes por 5 min cada com PBS Tween 20 (PBS-T) a 0,05 % e bloqueadas com PBS-TM (PBS-T acrescido de leite em pó Molico) a 1 % (250 µL/poço) por 1 h a 37° C. Após três lavagens de 5 min com PBS-T, as amostras de IgY precipitadas a partir das gemas (2 µg) e as de soro (1:200) foram diluídas em PBS-TM 1 % em um volume de 50 µL/poço em duplicatas e incubadas por 1 h a 37 °C. Nove controles negativos (9 amostras cada, semanas 0-8) constituíram-se das amostras de gema e soro dos animais controle (grupo G II). Após novas lavagens com PBS-T 0,05%, o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado na diluição 1:15.000 no volume final de 50 µL/poço e incubado por 1 h a 37° C. Após três lavagens de 5 min, a reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço de o-fenilenodiamina (OPD) 5 mg (Sigma-Aldrich Co., EUA) acrescido de 5 µL de H₂O₂ 30 % (Merck, Alemanha) diluídos em 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL/poço de solução de H₂SO₄ a 2 N (Merck, Alemanha) após 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em leitor de microplacas Epoch *microplate spectrophotometer* (Biotek, EUA). O *cut-off* das amostras em duplicata provenientes das gemas e do soro obtidos semanalmente foi calculado pela soma das médias de densidade óptica (DO) das amostras dos animais controle (9 amostras cada, semanas 0-8) mais três vezes o desvio padrão. O índice ELISA (IE) foi calculado pelo valor de DO obtido em cada diluição dividido pelo *cut-off*. IE > 1 foram considerados positivos.

3.11. ELISA indireto para verificação da maturação da avidéz de IgY

A maturação de avidéz dos anticorpos IgY anti-FhTc foi verificada pelo tratamento dos imunocomplexos formados com ureia 6 M, seguida pela determinação da reatividade residual por meio de ELISA indireto, de acordo com Vilibic-Cavlek et al. (2016), com modificações. Microplacas de alta afinidade (Corning Costar, Sigma-Aldrich, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de antígenos FhTc (10 µg) em tampão carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e armazenadas *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Após a sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes por 5 min cada com PBS-T 0,05 % e depois bloqueadas com PBS-T-M 1 % (250 µL/poço) por 30 min a 37 °C. Posteriormente, mais três lavagens de 5 min foram realizadas. Na etapa de incubação dos anticorpos IgY purificados com o antígeno FhTc, metade dos poços foi incubada com

50 µL de uma solução de ureia 6 M diluída em PBS (pH 7,2) e a outra metade com PBS (pH 7,2), por 5 min a temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas com auxílio de uma pipeta em cinco ciclos consecutivos com PBS-T (200 µL/poço). A detecção da reatividade residual foi realizada pela incubação com anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich, EUA), na diluição de 1:15.000, por 1 h a 37 °C. As etapas de revelação e tempo de leitura da DO foram realizadas de maneira idêntica ao ensaio de cinética. O cálculo do índice de avides (IA) para cada amostra de IgY anti-FhTc, foi realizado por meio da determinação da razão entre a absorbância (Abs) obtida nos anticorpos tratados com ureia (U⁺) e dos não tratados com ureia (U⁻). O grau de afinidade antígeno-anticorpo foi definido como baixa avides (IA < 40 %) e alta avides (IA > 60 %) e o resultado foi expresso na forma de porcentagem, conforme a fórmula: $IA = (Abs\ U^+ / Abs\ U^-) \times 100$ (VILIBIC-CAVLEK et al., 2016).

3.12. Purificação dos anticorpos IgY provenientes da gema

Um *pool* de anticorpos IgY obtido da 6^a e 8^a semanas, escolhidas por terem apresentado maiores índices de produção e reatividade nos ensaios de cinética e avides, foi dialisado e concentrado em sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA) com membrana de 30 kDa (AMICON YM 30, EUA) e tampão fosfato de sódio 0,02 M, sulfato de potássio 0,5 M, pH 7,5. Subsequentemente, o *pool* foi submetido à coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5 mL (GE Healthcare, EUA), previamente equilibrada com o mesmo tampão. Os anticorpos foram eluídos num fluxo de 1 mL/min utilizando um gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 7,5) no sistema completo de cromatografia líquida *ÄKTA prime plus* (GE Healthcare, EUA). Posteriormente, o *pool* foi submetido a um processo de diálise com água ultrapura, concentrado por uma unidade de filtro centrífugo AMICON Ultra-15 (Sigma-Aldrich, EUA) a 3.000 x g por 20 min a 24 °C em oito ciclos, para obtenção do volume máximo de anticorpos. Os anticorpos IgY purificados foram recolhidos, dosados a 280 nm por espectrofotômetro (Biodrop Ulite, Reino Unido) e armazenados a -20 °C para consequentes análises.

3.13. SDS-PAGE 12 % para avaliação dos anticorpos IgY fracionados e purificados

As etapas resultantes dos processos de fracionamento e purificação dos anticorpos IgY foram realizadas sob condições redutoras e avaliadas para cada etapa do protocolo de fracionamento e *pool* obtido após o processo de purificação, segundo Laemmli (1970), com modificações. Alíquotas de 10 µg de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (tampão Tris-HCl 100 mM [pH 6,8] + SDS 4 % + azul de bromofenol 0,2 % + glicerol 20 %) com acréscimo de β-mercaptoethanol 5 % (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram fervidas por 5 min em banho-maria e aplicadas em gel de concentração 12 % (tampão Tris-HCl 0,375 M [pH 8,8]; dodecilsulfato de sódio [SDS] 0,1 %, EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1]; tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125 %; persulfato de amônio [APS] 0,125 %). A eletroforese foi realizada utilizando-se o sistema completo SE-300 miniVE *vertical electrophoresis* (Hoefer, Inc., San Francisco, EUA) em corrente de 20 mA/gel e tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 5,5 mM SDS). Para identificação dos pesos moleculares em kilodaltons (kDa) das proteínas, foi utilizado um marcador padrão de peso molecular RECOM™ BLUE *Wide Range* (Royal Biotech Corporation, Taiwan). As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant blue* G-250 (Sigma-Aldrich, EUA) e mensuradas por regressão linear, de acordo com o padrão de peso molecular referência, utilizando o programa *GelAnalyzer* 2010 (Dr. Istvan Lazar®).

3.14. Dot blot para confirmação da purificação dos anticorpos IgY

Para confirmação da presença de IgY nas amostras obtidas após o processo de purificação (item 3.12), o *pool* de anticorpos foi aplicado em membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad, EUA). Um volume de 20 µL da amostra purificada foi adsorvido à membrana. Após secagem da mesma, em temperatura ambiente, foi realizado bloqueio com PBS-T-M 5 %, por 2 h, sob agitação lenta em temperatura ambiente. Após o bloqueio, foram realizados seis ciclos de lavagem consecutivos com PBS-T 0,05 %. Os anticorpos IgY foram detectados pela adição de anticorpos anti-IgY na diluição de 1:20.000 em PBS-T-M 1 %, e incubados por 2 h à temperatura ambiente. Após seis lavagens com PBS-T, a reação foi revelada pela adição de uma pastilha de 3,3'-*diaminobenzidino tetrahydrocloro* (DAB) (Sigma-Aldrich, EUA) diluída em 5 mL de solução salina tamponada com Tris (TBS) e 12 µL de peróxido de hidrogênio 30 % (Merck, Alemanha).

A revelação foi interrompida por meio de seis lavagens consecutivas com água destilada. O controle negativo foi realizado com soroalbumina bovina (BSA) nas mesmas condições.

3.15. *Western Blotting*

O reconhecimento do perfil antigênico de *FhTc* pelos anticorpos IgY fracionados semanalmente e purificados foi avaliado em *Western Blotting* conforme Silva et al. (2007).

A princípio, 250 µg de *FhTc* foram submetidos à separação por SDS-PAGE 12 %, sob condições não redutoras, conforme descrito no item 3.6. Em seguida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories Inc., EUA) de dimensões: 8 cm de largura x 6 cm de altura, utilizando o sistema de transferência SE-300 miniVE (Hoefler, Inc., San Francisco, EUA) em corrente de 300 mA/gel e tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 5,5 mM, metanol 20 %). Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (Sigma-Aldrich, EUA) para visualização das bandas proteicas. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras de 3 mm de largura que foram bloqueadas pela incubação com PBS-T-M 5 %, por 2 h sob agitação lenta à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as tiras foram lavadas seis vezes com PBS-T 0,05 % e incubadas *overnight* sob agitação lenta a 4 °C com anticorpos IgY anti-*FhTc* (6 µg) diluídos em PBS-T-M 1 % a um volume de 500 µL por tira. Foram utilizadas amostras de IgY fracionado de todas as semanas e do *pool* purificado da 6ª e 8ª semanas. Finalizada essa etapa, as fitas foram novamente lavadas, conforme descrito acima. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1:15.000 em PBS-T-M 1 %, por 2 h à temperatura ambiente. A revelação foi realizada conforme item 3.14. A reação foi interrompida com 500 µL de água destilada por tira.

3.16. Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado para avaliar o reconhecimento antigênico em cortes de metacéstódeos de *T. crassiceps* e *T. solium* por anticorpos IgY purificados anti-*FhTc*. Os cortes histológicos foram incluídos em *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda) e congelados a -70 °C. Secções de 2 µm de espessura foram obtidas utilizando criomicrotomo (Leica Microsystems, EUA). Os cortes foram aderidos em lâmina de microscopia e mantidos 30 min a temperatura ambiente. A cada

corte foram adicionados 50 µL de anticorpos IgY anti-FhTc purificados com concentração proteica total de 780 µg/mL provenientes do *pool* da 6ª e 8ª semanas, que foram incubados a 37 °C por 30 min, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS três vezes e incubados com anticorpo secundário anti-IgY produzido em coelhos conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em azul de Evans 3 %, por 30 min a 37 °C. Após três lavagens com PBS, as lâminas foram montadas com lamínulas utilizando glicerina. As imagens foram obtidas utilizando sistema de microscopia de fluorescência invertida (EVOS, AMG *Microscopy Group*, EUA). O controle do conjugado foi realizado com PBS (50 µL/poço).

3.17. ELISA sanduíche para detecção de imunocomplexos em soros humanos com NCC confirmada

Os anticorpos IgY purificados e específicos foram avaliados quanto ao potencial para detecção de imunocomplexos em soros humanos com NCC confirmada. O ELISA sanduíche foi realizado em placas de poliestireno, 96 poços, de alta afinidade (Santa Cruz *Biotechnology*, CA, EUA) sensibilizadas com IgY anti-FhTc (10 µg) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubados *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Após a incubação com os anticorpos IgY, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. As amostras de soro humano (positivos para NCC, saudáveis e outras parasitoses) foram diluídas em PBS-T a 1:200, adicionadas às placas em volume de 50 µL/poço e incubadas por 45 min a 37 °C. As placas foram lavadas como descrito anteriormente e incubadas com anticorpo secundário IgG produzido em cabras anti-IgG humana conjugado com peroxidase, Fc específico (Sigma-Aldrich, EUA) e diluídos a 1:2000 em PBS-T. Após incubação de 45 min a 37 °C, as placas foram lavadas conforme descrição anterior e reveladas de acordo com o item 3.10. Os valores de absorbância foram determinados a 492 nm em leitor de microplacas Epoch (Biotek). Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO/cut-off$, onde o *cut-off* foi estabelecido pela análise da curva ROC (*Receiver operating characteristic curves*), utilizando os valores de DO das amostras de soro de todos os indivíduos saudáveis e com outras parasitoses (n = 70), como controle negativo. Amostras foram consideradas positivas quando $IE > 1$.

3.18. Normas de biossegurança

O procedimento de coleta e processamento das amostras de soros e reagentes, bem como de utilização dos equipamentos foi realizado de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo et al. (2009).

3.19. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa computacional *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis foram avaliadas pelos testes de normalidade D'Agostino e Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, segundo a distribuição dos dados. Os parâmetros de sensibilidade, especificidade, razões de probabilidade positiva (RP^+) e negativa (RP^-), área sob a curva (ASC) e os valores de *cut-off* para o ELISA foram avaliados pela curva ROC. *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey ($P < 0,0001$) foram realizados para comparar as diferenças de variância das médias entre pares de grupos de soros. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização antigênica do extrato salino total e da fração hidrofóbica de *Taenia crassiceps*

Proteínas do extrato salino total de *T. crassiceps* (EtTc) e de sua fração hidrofóbica (FhTc), com concentrações de 14.000 µg/mL e 2.000 µg/mL, respectivamente, foram caracterizadas por SDS-PAGE 12 % por coloração com nitrato de prata. Doze bandas proteicas foram identificadas para EtTc (240, 140, 100, 70, 50, 42, 32, 27, 19, 16, 14 e 10 kDa) e quatorze bandas para FhTc (92, 56, 50, 47, 45, 42, 36, 34, 32, 29, 28, 23, 8 e 6 kDa) (Figura 2).

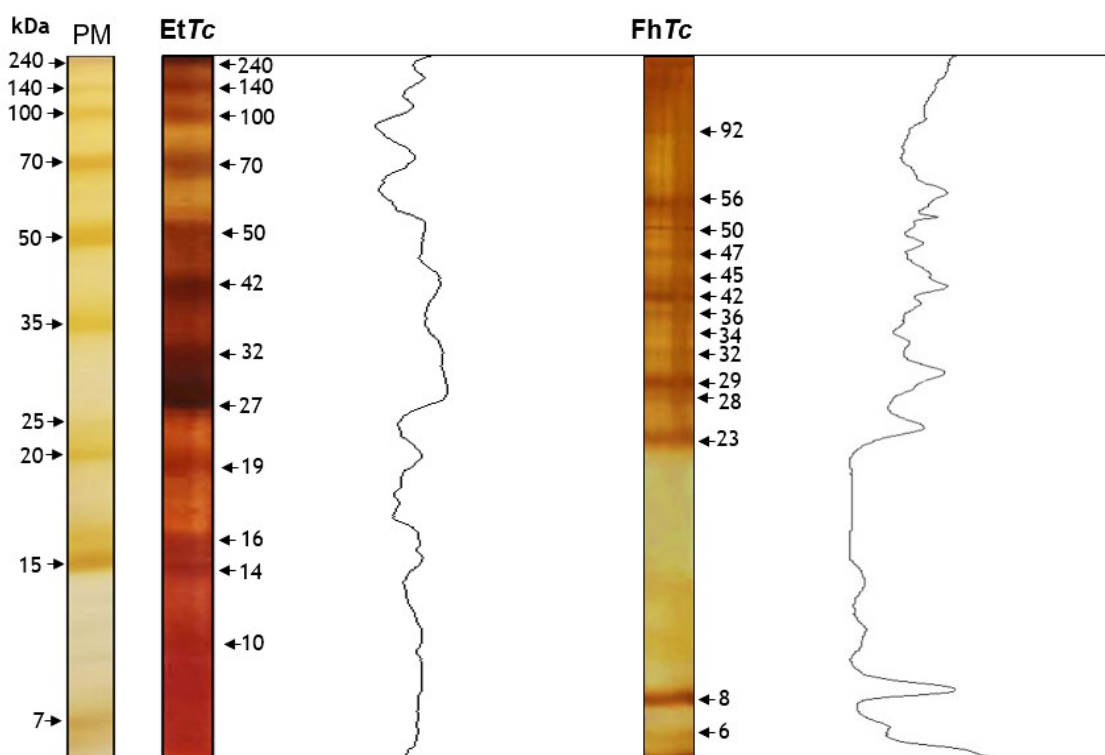


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% com as regiões proteicas do extrato salino total de metacestódeos de *T. crassiceps* (EtTc) e sua fração hidrofóbica (FhTc), obtida por fracionamento com TX-114. As bandas proteicas foram coradas com nitrato de prata. PM = Padrão de peso molecular. kDa = kilodalton.

4.2. Avaliação do fracionamento e purificação dos anticorpos IgY

Para avaliação da qualidade do processo de fracionamento e purificação dos anticorpos IgY, foram retiradas frações de cada uma das etapas dos processos para análise do perfil proteico. Previamente à etapa de fracionamento, foi obtida uma fração de solução de gemas (G) da sexta e oitava semanas. Na primeira etapa do processo de fracionamento, chamada delipidação, foi obtido o sobrenadante de fração lipídica (S1) e seu precipitado (P1). Na segunda etapa, após a adição de sulfato de amônio 20 %, o sobrenadante (S2) e seu precipitado formado (P2) foram coletados, assim como anticorpos precipitados da sexta semana (6S) e oitava semana (8S) (Figura 3). A quantidade de anticorpos obtida ao fim de cada semana variou de 2.852 $\mu\text{g/mL}$ (semana 0) a 9.186 $\mu\text{g/mL}$ (semana 8) (Tabela 1).

A etapa de purificação iniciou-se com o processamento do *pool* de anticorpos IgY da sexta e oitava semanas por cromatografia de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA *prime* (GE Healthcare, EUA). A cada corrida na coluna cromatográfica, foi aplicado 1 mL de amostra com anticorpos IgY precipitados, concentrados e dialisados na concentração aproximada de 8.000 $\mu\text{g/mL}$, que gerou 14 amostras de anticorpos IgY (tubos 37-51) (Figura 4), com rendimento aproximado de 2.000 a 3.000 $\mu\text{g/mL}$ por corrida.

Após a purificação foi realizada a concentração das amostras de anticorpos IgY eluídos a partir do ÄKTA pelo filtro centrífugo AMICON Ultra-15 (Sigma-Aldrich, EUA). Ao término do processo, obteve-se um rendimento de 780 $\mu\text{g/mL}$.

Após o processamento pelo filtro centrífugo, uma alíquota de 20 μL do *pool* foi submetida a ensaio *Dot-blot* e aplicada em membrana de nitrocelulose 0,45 μm . Todas as amostras revelaram a presença de moléculas IgY, confirmando a purificação (Figura 5). Após a confirmação, foi realizada análise do perfil eletroforético do *pool* de anticorpos para comparação com as etapas de fracionamento. Após o tratamento com β -mercaptoethanol 5 %, para quebra das pontes dissulfeto entre as cadeias leves e pesadas da IgY, os anticorpos do precipitado P2 e os anticorpos da sexta e oitava semanas (6S e 8S) apresentaram o mesmo perfil, indicando a presença de cadeias pesadas (65-70 kDa) e cadeias leves (20-22 kDa). A presença da ovoalbumina (\sim 42 kDa) foi detectada nas amostras de anticorpos prévias ao processo de purificação. O *pool* de anticorpos (*p*) apresentou apenas cadeias pesadas (66-70 kDa), conforme figura 3.

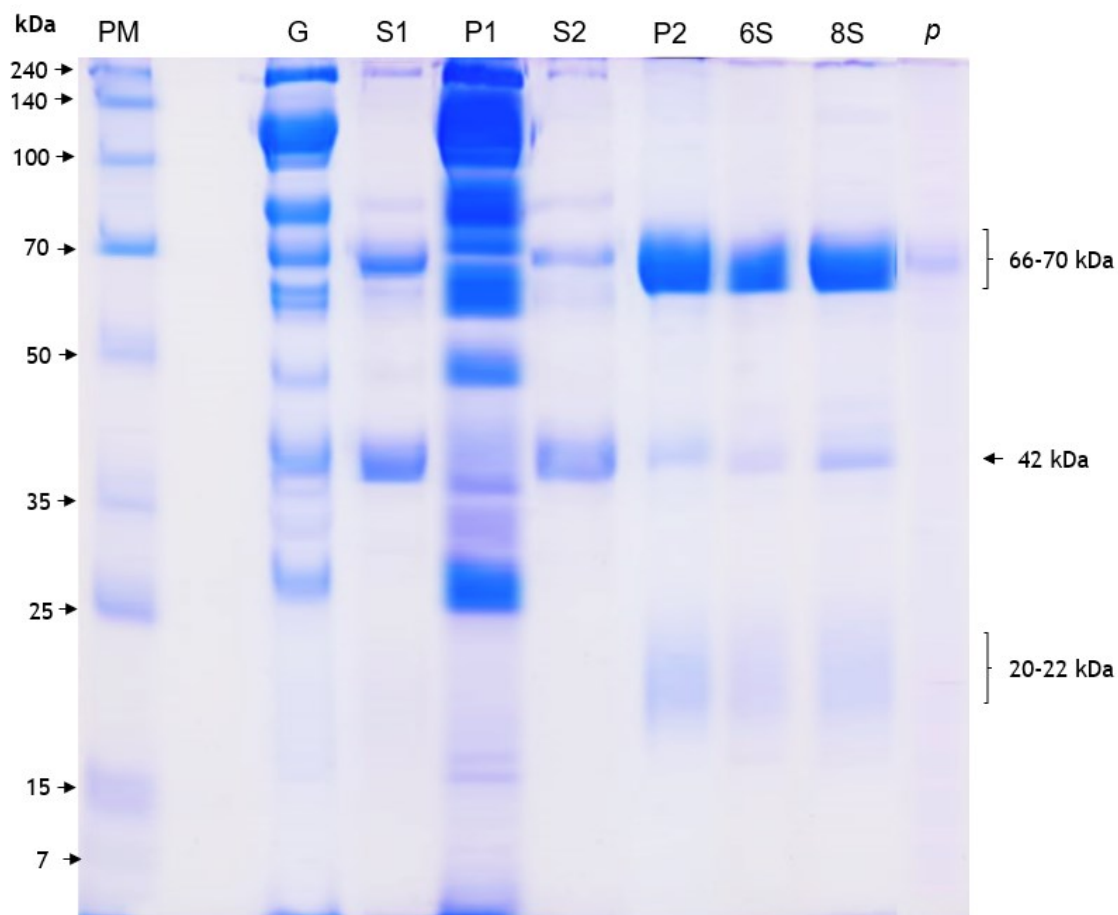


Figura 3. SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras das etapas dos processos de fracionamento e purificação de anticorpos IgY anti-FhTc. **G** – solução de gema obtida previamente ao protocolo de fracionamento; **S1** – sobrenadante proteico da fração lipídica; **P1** – precipitado lipídico; **S2** – sobrenadante pós precipitação proteica; **P2** – precipitado rico em IgY após precipitação com sulfato de amônio; **6S** – anticorpos precipitados da sexta semana; **8S** – anticorpos precipitados da oitava semana; **p** – *pool* de anticorpos da 6^a e 8^a semanas obtido após o processo de purificação em resina de sefarose (*HiTrap IgY Purification*, HP, 5 mL). A seta indica as bandas correspondentes à ovoalbumina. Os colchetes indicam as regiões proteicas de cadeias pesadas e leves da IgY. PM = Padrão de peso molecular. kDa = kilodalton.

Tabela 1. Quantidade obtida em miligramas por mililitro (mg/mL) dos anticorpos IgY anti-FhTc após os processos de fracionamento e purificação no decorrer da atividade experimental.

<i>Semana</i>	<i>Concentração (mg/mL)</i>	
	Pós fracionamento	Pós purificação
0	2,852	-
1	3,576	-
2	4,179	-
3	4,900	-
4	5,243	-
5	8,374	-
6	8,920	2,346
7	8,522	-
8	9,186	2,985

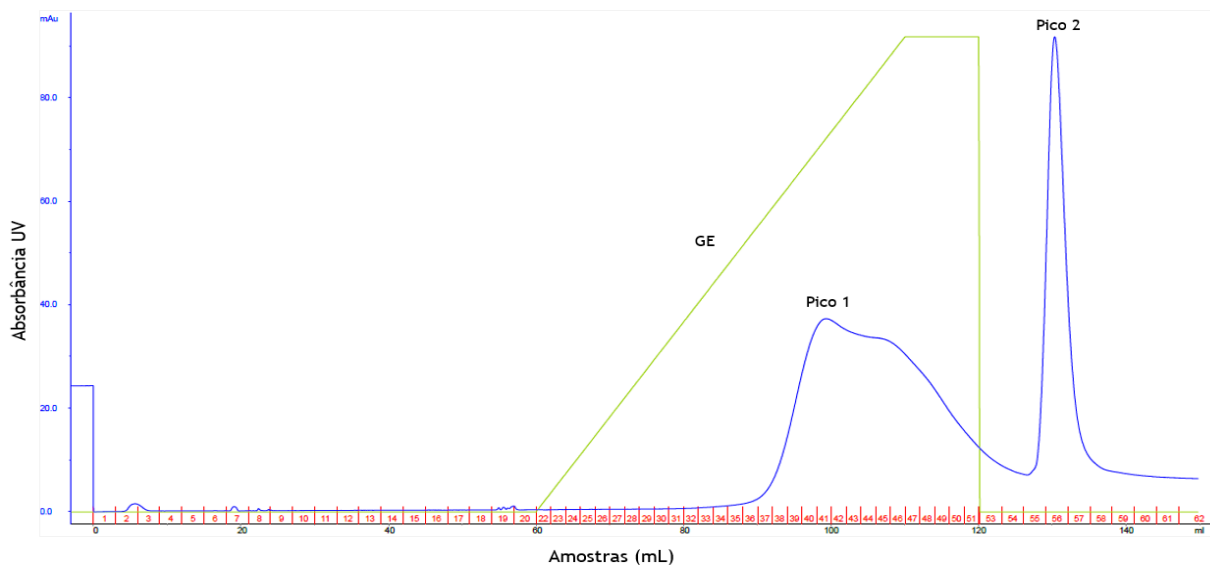


Figura 4. Cromatograma dos anticorpos IgY anti-FhTc. O primeiro pico corresponde aos anticorpos IgY adsorvidos à coluna cromatográfica (tubos 37-51) (Pico 1) que foram utilizados nas etapas posteriores. As amostras do segundo pico (55-58) (Pico 2) correspondem à ovoalbumina. GE = gradiente de eluição.

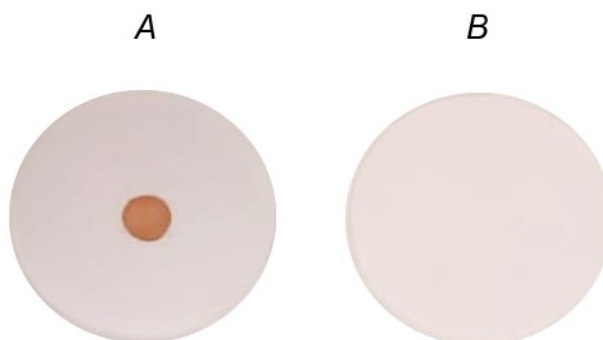


Figura 5. Ensaio *Dot-blot* para confirmação da presença de anticorpos IgY purificados anti-FhTc após processamento cromatográfico. **A**- anticorpos IgY purificados. **B** - BSA. Soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada como controle negativo da reação. As membranas foram coradas com DAB (Sigma-Aldrich, EUA).

4.3. Avaliação da produção, maturação da avidéz e potencial de reconhecimento antigênico dos anticorpos IgY

Os anticorpos IgY obtidos após o processo de fracionamento das gemas foram inicialmente avaliados quanto à cinética de produção por ELISA indireto. Foram utilizadas amostras semanais das gemas e do soro. Os anticorpos IgY provenientes das gemas iniciaram a produção na segunda semana e tiveram suas maiores concentrações na sexta e oitava semanas. A soroconversão dos anticorpos teve início na segunda semana e permaneceu constante a partir da quarta semana (Figura 6).

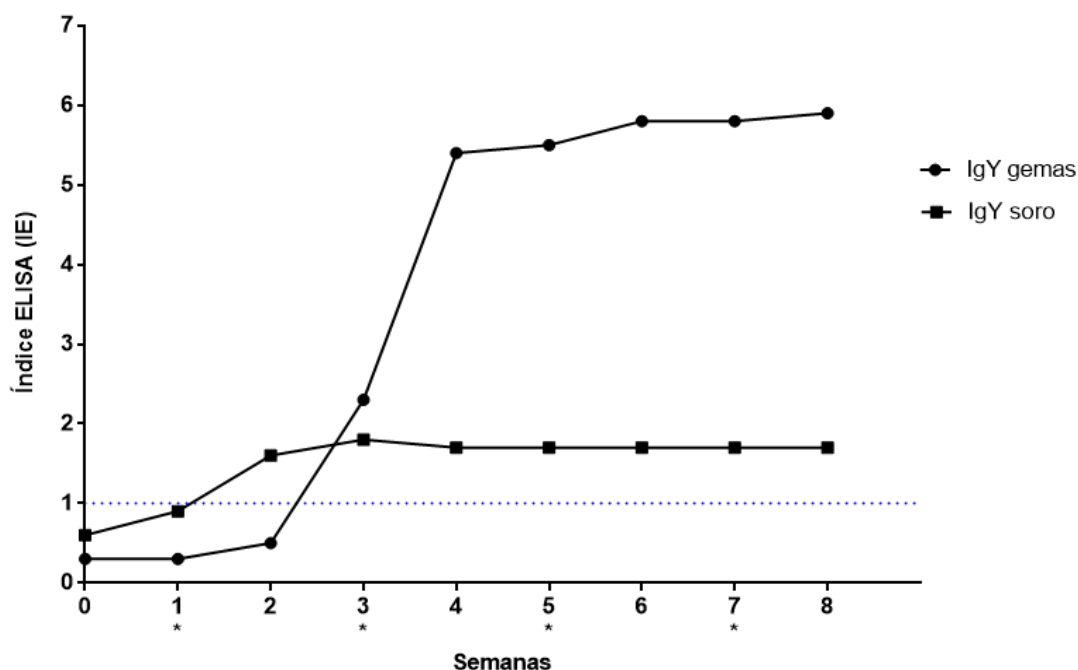


Figura 6. Cinética de produção dos anticorpos IgY específicos anti-FhTc fracionados a partir das gemas e do soro coletados semanalmente no decorrer da atividade experimental. Linha pontilhada representa o *cut-off* (Índice ELISA, IE > 1); semana 0 = Pré-imunização; * = Imunizações.

A maturação da avidéz dos anticorpos foi testada por ELISA indireto, utilizando ureia 6 M como agente caotrópico. Os anticorpos fracionados das gemas a partir da segunda semana foram selecionados para teste. Os índices de avidéz (IA %) variaram de 66,1 % (segunda semana) a 95,08 % (oitava semana) e tiveram seus maiores valores na sexta e oitava semanas, 88,17 % e 95,08 % respectivamente (Figura 7).

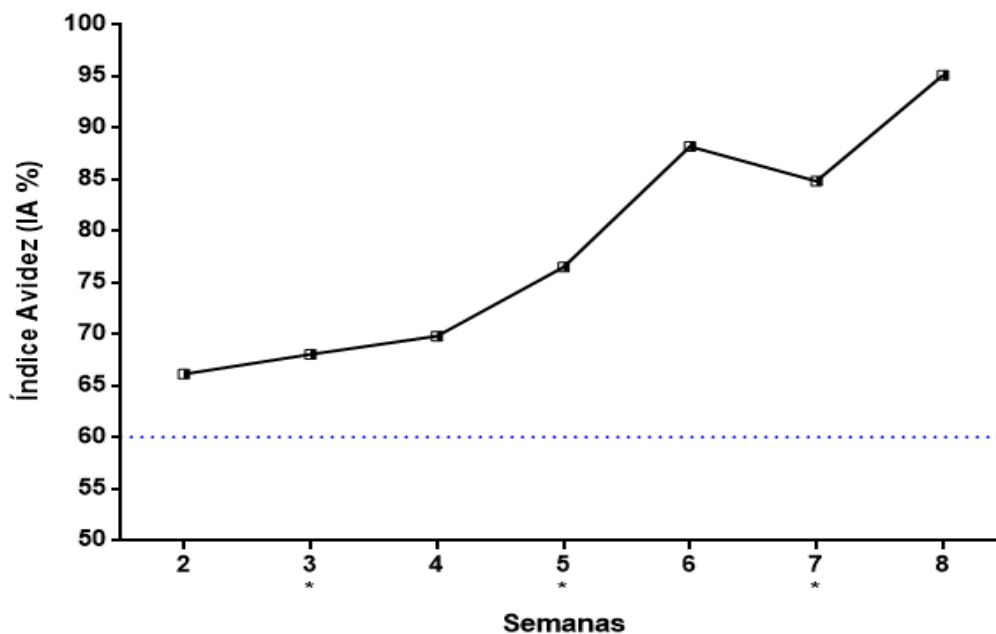


Figura 7. Maturação da avidéz de anticorpos IgY específicos anti-FhTc (provenientes de gemas) durante a atividade experimental, após a primeira imunização com fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (FhTc). Ureia 6 M foi utilizada como agente caotrópico. * = Imunizações. O Índice Avidéz (IA > 60 %) foi calculado de acordo com as semanas que apresentaram IE >1 no ensaio de cinética de produção de anticorpos. As semanas que apresentaram IA > 85 % foram selecionadas para ensaios posteriores. Linha pontilhada representa o *cut-off* (IA > 60 %).

O potencial de reconhecimento antigênico foi avaliado por *Western Blotting* com os anticorpos IgY anti-FhTc fracionados de cada semana (0 a 8) e purificados (*pool*). Houve reconhecimento de apenas duas bandas (80 e 70 kDa) a partir da terceira semana (Figura 8).

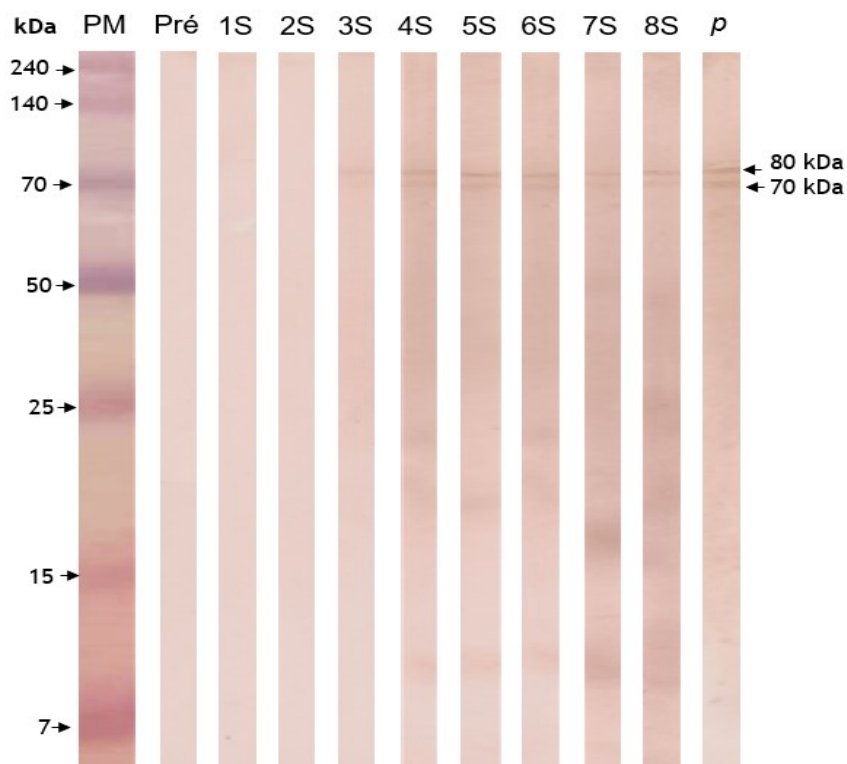


Figura 8. *Western Blotting* evidenciando perfil de reconhecimento antigênico da fração hidrofóbica de metacestódeos de *Taenia crassiceps* (FhTc) por anticorpos IgY anti-FhTc fracionados semanalmente e purificados (*pool*). As membranas foram coradas com DAB (Sigma-Aldrich, EUA). PM = Padrão de peso molecular. S = semana. *p* = *pool*. kDa = kilodalton

4.4. Detecção de antígenos parasitários pela reação de imunofluorescência indireta

A reação de imunofluorescência indireta foi avaliada em cortes histológicos de metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium*. Em ambos os ensaios, os anticorpos IgY anti-FhTc purificados reconheceram estruturas tegumentares e internas dos parasitos. Foi utilizado PBS como controle do conjugado (Figura 9).

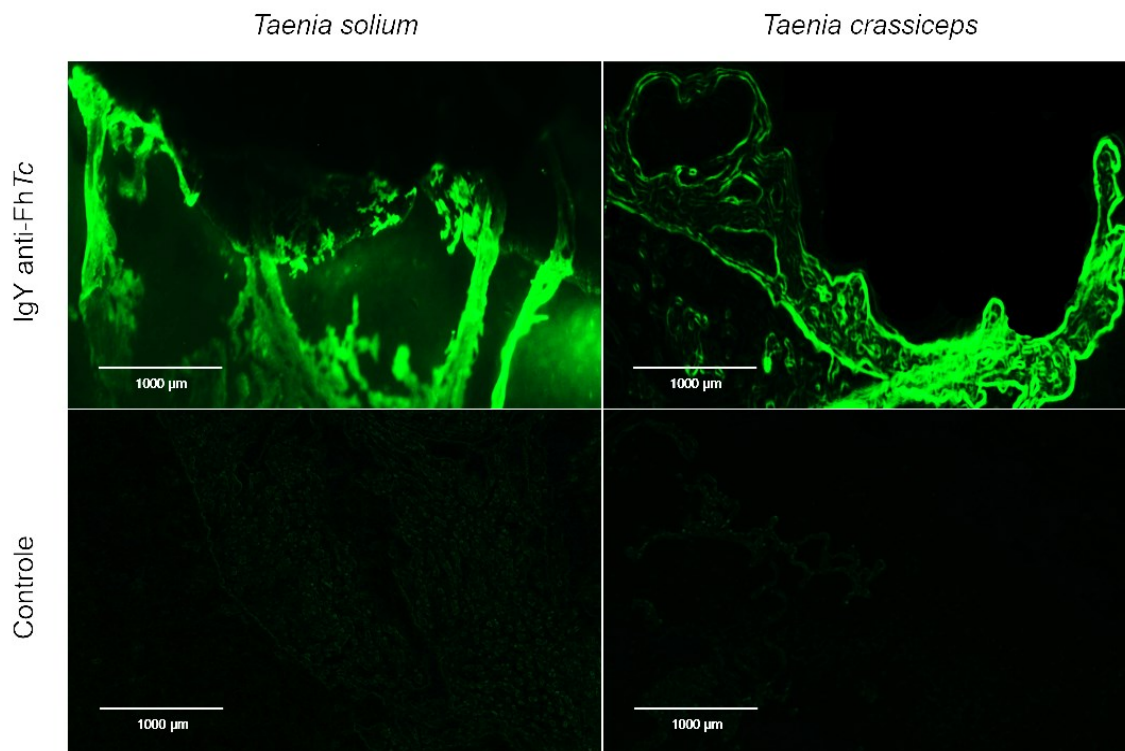


Figura 9. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando anticorpos IgY específicos anti-FhTc em cortes histológicos de *Taenia crassiceps* e *Taenia solium* (controle positivo). Coloração com anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Imagens obtidas por microscopia de fluorescência invertida (EVOS, AMG Microscopy Group, EUA).

4.5. Aplicação dos anticorpos IgY no imunodiagnóstico da NCC humana

Os anticorpos IgY anti-FhTc purificados foram aplicados no imunodiagnóstico da NCC humana para reconhecimento de imunocomplexos formados por IgG e antígenos parasitários em amostras de soros de indivíduos positivos para NCC, saudáveis e com outras parasitoses. Amostras de soro que apresentaram $IE > 1$ foram consideradas positivas.

A presença de imunocomplexos foi detectada em 93,2 % (41/44) das amostras de soro de indivíduos com NCC confirmada, sendo: 100 % em indivíduos com NCC ativa ($n = 22$) e 86,36 % com NCC inativa (19/22); 8,57 % (3/35) dos indivíduos saudáveis; e 11,43 % (4/35) com outras parasitoses, sendo: 2,86 % (1/35) *E. granulosus*, 2,86 % (1/35) *H. nana*, 2,86 % (1/35) *S. mansoni* e 2,86 % (1/35) *T. trichiura*.

Os valores diagnósticos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) totais apresentados foram 93,2 % (81,34 - 98,57 %, IC 95 %) e 94,3 % (86,01 - 98,42 % IC 95 %), respectivamente. O desempenho do teste indicado pela área sob a curva (ASC) foi de 0,9740 (IC 95 %). A razão de probabilidade positiva ($RP^+ = 16,35$) indicou elevado aumento na probabilidade da doença ($RP^+ > 10$). A razão de probabilidade negativa ($RP^- = 0,01$) indicou acentuado decréscimo na probabilidade da doença ($0 < RP^- < 1$). Os parâmetros diagnósticos de Se e Es para NCC ativa e inativa estão representados na Tabela 2.

A distribuição dos dados apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade pelos testes D'Agostino e Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov. *One-way* ANOVA foi realizada para comparar a diferença de variância entre as médias de DO's dos grupos de soros dos indivíduos. Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos grupos de soros ($F = 97,84$, $R = 0,7274$, $P < 0,0001$, IC 95 %). Comparações múltiplas foram realizadas pelo pós-teste de Tukey, para avaliar as diferenças de variância das médias de DO's entre os pares de grupos de soros. Houve significância na comparação entre o grupo de indivíduos NCC positivos (G1) e seus subgrupos com os saudáveis (G2) e outras parasitoses (G3) ($p < 0,0001$), exceto entre os subgrupos NCC ativa e NCC inativa e entre os grupos G2 e G3 (Figura 10).

Tabela 2. Parâmetros diagnósticos de sensibilidade (Se) e especificidade (Es) obtidos pela curva ROC na detecção de imunocomplexos em soros humanos com NCC ativa e NCC inativa.

Soros com NCC confirmada (G1)	
NCC ativa (22)	
Se (%)	100
Es (%)	94,3
ASC	0,9740
RP ⁺	17,54
RP ⁻	0
Valor de <i>P</i>	<0,0001
NCC inativa (22)	
Se (%)	86,4
Es (%)	94,3
ASC	0,9740
RP ⁺	15,15
RP ⁻	0,08
Valor de <i>P</i>	<0,0001
NCC total = 44 amostras	

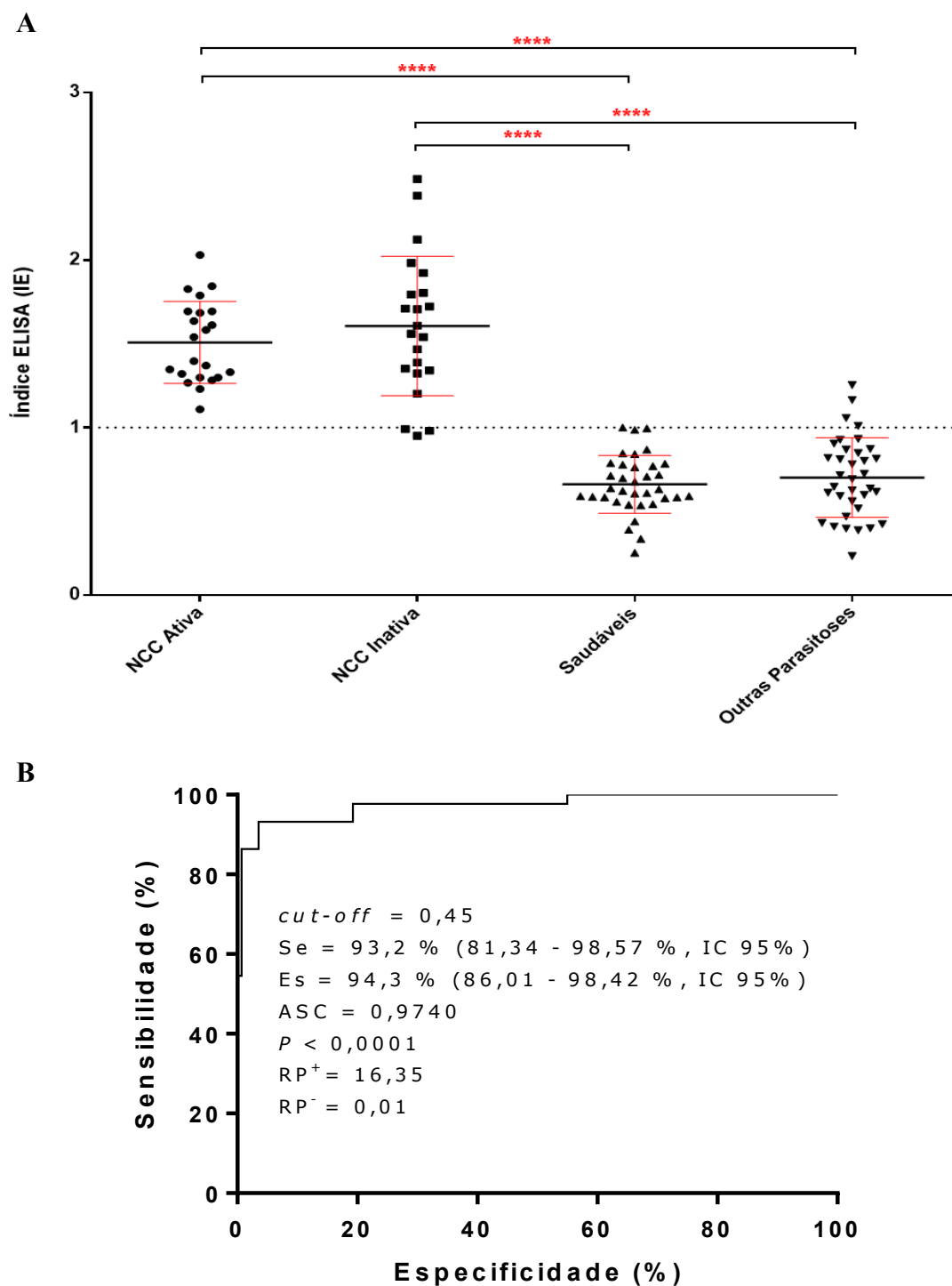


Figura 10. A. ELISA sanduíche para detecção de imunocomplexos formados por IgG e antígenos parasitários, utilizando anticorpos IgY específicos anti-FhTc em amostras de soro de indivíduos positivos para NCC (NCC ativa, $n = 22$; NCC inativa, $n = 22$), saudáveis ($n = 35$) e com outras parasitoses ($n = 35$). Amostras com $IE > 1$ foram consideradas positivas. **** = *One-way* ANOVA, com pós-teste de Tukey ($P < 0,0001$).

B. Curva ROC representando *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (ASC), valor de P e razões de probabilidade positiva (RP^+) e negativa (RP^-).

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico da NCC é laborioso devido à dificuldade de demonstração histológica dos parasitos, tendo em vista a não indicação da prática cirúrgica, na maioria dos casos. Técnicas aprimoradas de neuroimagem e testes imunológicos como ferramentas confirmatórias aumentaram a acurácia do diagnóstico da NCC, por meio da visualização de metacestódeos em diferentes estádios evolutivos no SNC e a demonstração de anticorpos específicos do hospedeiro e antígenos parasitários circulantes. Entretanto, a neuroimagem não confirma achados patognomônicos e os testes imunodiagnósticos apresentam sensibilidade e especificidade variadas. Nesse sentido, a obtenção de uma ferramenta sorológica de fácil produção e acessibilidade e com alta especificidade para o diagnóstico de NCC torna-se necessária (DEL BRUTTO et al., 2017; CARPIO et al., 2018).

O imunodiagnóstico não deve ser utilizado apenas para confirmação da NCC, mas também ser apto a discriminar infecções ativas e inativas. Ensaio indiretos de detecção de anticorpos, embora considerados inviáveis na diferenciação das formas ativas e inativas da NCC, têm sido mais eficazes que os testes de detecção de antígenos, que possuem sensibilidade inferior (MANHANI et al., 2011; RODRIGUEZ; WILKINS; DORNY, 2012).

Somente testes baseados na detecção de anticorpos específicos para antígenos de *T. solium* são confiáveis para diagnóstico clínico e estudos epidemiológicos. Entretanto, os resultados de testes sorológicos altamente específicos devem ser avaliados criticamente porque a cisticercose extraneural e até mesmo a exposição sem desenvolvimento de infecção ativa podem resultar em desenvolvimento de anticorpos específicos. Esses ensaios estão limitados ao uso de antígenos glicoproteicos derivados de metacestódeos de *T. solium*, como o EITB de glicoproteína ligada à lectina de lentilha (LLGP-EITB), que utiliza extratos antigênicos parcialmente purificados (DEL BRUTTO et al., 2001). Entretanto, o uso de anticorpos monoclonais nesses ensaios pode ser extremamente útil para validar o diagnóstico da NCC ou descartar diagnósticos de imagem não-conclusivos (GARCIA, 2018).

O EITB é considerado o teste mais específico, com sensibilidade de 98 % e especificidade de 100 % (SAMOREK-PIERÓG; KARAMON; CENCEK, 2018), em indivíduos com dois ou mais metacestódeos cerebrais (GARCIA, 2018). Uma menor sensibilidade pode ser devida à falta de uma resposta antigênica de metacestódeos

calcificados em comparação com os viáveis (RAMACHANDRAN; WILSON, 2018). Além disso, o EITB pode apresentar desempenho insatisfatório em amostras de pacientes com lesões únicas e ser limitado pelo uso dificultado em áreas endêmicas (SINGHI; SUTHAR, 2015). A PCR também tem sido utilizada no que tange à diferenciação específica de *Taenia* spp., no entanto, possui limitações na distinção de formas ativas e inativas da NCC (SAMOREK-PIERÓG; KARAMON; CENCEK, 2018).

ELISA para detecção de anticorpos é um método sensível e permite a análise de várias amostras simultaneamente. Entretanto, o potencial diagnóstico do método é alterado por diversos fatores, como a dificuldade de escolha das amostras de soro de referência, aplicação de antígenos parasitários brutos e variados valores de especificidade e sensibilidade, resultando em alto número de reações cruzadas com outras parasitoses, como fasciolose, angiostrongilíase, esquistossomose, equinococose, esparganose (SAMOREK-PIERÓG; KARAMON; CENCEK, 2018) e himenolepiase, principalmente em regiões endêmicas à cisticercose (GARCIA, 2018). Atualmente, muitos pesquisadores tendem a utilizar proteínas sintéticas ou recombinantes cuja especificidade é maior que a dos antígenos nativos, entretanto, a sensibilidade é variada (RIBEIRO et al., 2010a; GAZARIAN et al., 2012; NOH et al., 2014; RIBEIRO et al., 2019).

O presente estudo propôs a utilização de um antígeno hidrofóbico de *T. crassiceps* (antígeno FhTc) para produzir anticorpos IgY específicos obtidos de galinhas imunizadas com FhTc e testá-los no diagnóstico da NCC. Antígenos de metacestódeos de *T. crassiceps* substituem eficientemente aqueles de *T. solium* no imunodiagnóstico da NCC (LARRALDE et al., 1989; VAZ et al., 1997).

Na tentativa de aprimorar os ensaios baseados na detecção de antígenos específicos, os anticorpos IgY policlonais surgem como promissores para o diagnóstico da NCC humana. Os anticorpos IgY são excelentes para uso em ensaios imunológicos envolvendo soros de mamíferos, devido às diferentes propriedades da IgY em comparação com a IgG, uma vez que a IgY não reage com o fator reumatoide, não ativa o sistema complemento e não se liga ao receptor Fc (HODEK et al., 2013; AMRO; AL-QAISI; AL-RAZEM, 2017). Além desses fatores, devido às diferenças estruturais, imunológicas, bioquímicas e à distância filogenética entre aves e mamíferos, a IgY em comparação à IgG é capaz de gerar respostas a proteínas altamente conservadas que não provocam facilmente uma resposta imunitária em espécies de mamíferos. Essas características permitem o desenvolvimento e aplicações imunodiagnósticas e imunoterápicas mais eficientes (LEE et al., 2017). As principais vantagens que tornam a IgY atraente à pesquisa

e às práticas diagnósticas, são: (1) baixo custo e rápida produção em larga escala a partir da gema de ovos de aves, evitando a sangria de animais com seringas; (2) alta rentabilidade de anticorpos (1500 mg de IgY total podem ser obtidos semanalmente a partir de 5 a 7 ovos de galinhas, comparados com 200 mg de IgG total de coelho por 40 mL de sangue semanais); (3) maior tempo de armazenamento da IgY (por pelo menos um ano) em câmara fria ou congelado, (4) produção de anticorpo específico para pequenas doses de antígeno (SCHADE et al., 1996; HODEK et al., 2013; AMRO; AL-QAISI; AL-RAZEM, 2017).

A IgY tem sido amplamente utilizada em estudos de diagnóstico laboratorial e biotecnológicos na medicina humana e veterinária, por meio da imunização de galinhas com antígenos de *E. granulosus* (GOTTSTEIN; HEMMELER, 1985), *Ascaris suum* (SCHNIERING.; SCHADE; HIEPE, 1996), vírus Coxsackie (SINNREICH et al., 2005), cadeia gama da hemoglobina humana para aplicação no imunodiagnóstico da talassemia (JINTARIDTH et al., 2006), apolipoproteína B (ApoB) para diagnóstico da aterosclerose (SATO et al., 2008), *T. solium* (MANHANI et al., 2011), *Schistosoma japonicum* (CAI et al., 2012), *Trichinella spiralis* (WANG et al., 2012) *Toxoplasma gondii* (FERREIRA Jr. et al., 2012), câncer (GRZYWA et al., 2014), rotavírus bovino (KIM et al., 2017), *Escherichia coli* (PERALTA et al., 2017), toxinas de serpentes (ROCHA et al., 2017; BORGES, et al., 2018), toxinas A e B de *Clostridium difficile* (XING et al., 2017). A aplicação de antígenos em galinhas tornou-se uma ferramenta promissora para a caracterização e entendimento da funcionalidade dos anticorpos IgY, bem como a produção de anticorpos específicos capazes de aprimorar técnicas imunodiagnósticas e terapêuticas (SCHADE et al., 2005; LEE et al., 2017).

Os anticorpos IgY produzidos neste estudo apresentaram crescentes índices de cinética de produção no decorrer do curso da infecção, o que foi observado em outros trabalhos. Raposo et al. (2016), verificaram aumento constante nos níveis de IgY no curso da infecção de galinhas com ovos embrionados de *Toxocara canis*. No presente estudo foi observado que a cinética de produção de anticorpos nas gemas se iniciou a partir do 15º dia pós infecção (dpi), o que coincidiu com a soroconversão, corroborando com Raposo et al. (2016) e Ferreira-Junior et al. (2012), que também observaram elevados níveis de produção de anticorpos após o 14º dpi com *T. gondii* em aves. No presente estudo, os anticorpos atingiram seus maiores níveis de produção a partir do 29º dia, permanecendo constantes a partir do 43º dpi, o que corroborou com os achados de Raposo et al. (2016), que apresentaram níveis constantes de anticorpos a partir do 45º dpi. No que se refere aos

índices de avidéz (IA %), os níveis de anticorpos cresceram a partir do 15º dpi e tiveram seus maiores índices (IA > 85 %) no 43º e 57º dpi, contrastando com Raposo et al. (2016), que tiveram maiores IA após a fase final de infecção (28º dpi, IA > 56 %). Ferreira-Junior et al. (2012), também observaram elevado nível de maturação de anticorpos IgY, tratados com ureia 6 M, no 42º dpi, assim como ligeira queda nos níveis de avidéz de anticorpos no 49º dpi, corroborando com o presente estudo, cuja queda foi observada no 50º dpi.

A aplicação dos anticorpos IgY específicos anti-FhTc para detecção de imunocomplexos em amostras de soro com NCC confirmada e na discriminação das formas ativa e inativa da doença no presente estudo, demonstrou alto desempenho diagnóstico, quando comparada com outros estudos. Molinari et al. (2002) utilizaram antígenos de excreção e secreção de metacéstódeos de *T. solium* para detecção de anticorpos IgG de LCR humano por ELISA para diagnóstico discriminatório da NCC, obtendo 92 % (Se) e 97 % (Es) com 22 amostras positivas de 24 casos com NCC ativa e seis amostras negativas de oito casos com NCC inativa. No presente estudo, todas as 22 amostras com NCC ativa positivaram e apenas três de 22 amostras com NCC inativa foram negativas, com 93,2 % (Se) e 94,3 % (Es). Silva et al. (2017) avaliaram a detecção de IgG humana anti-*T. solium* contra frações hidrofóbicas de *T. solium* e *T. crassiceps* em amostras de LCR de indivíduos com NCC ativa e inativa, e obtiveram 100 % (Se) e 97,4 % (Es) para ambas as formas clínicas da doença (ativa e inativa) quando utilizada a fração hidrofóbica de *T. crassiceps* e 100 % (Se) e 95 % (Es) quando utilizada a fração hidrofóbica de *T. solium*. No presente estudo, 100 % (22/22) das amostras de NCC ativa e 86 % (19/22) das inativas reagiram. Garcia et al. (2018) testaram amostras de soro humano com NCC viável (n = 45) e calcificada (n = 45), bem como soros de indivíduos com outros cestódeos (himenolepíase, n = 45 e hidatidose, n = 45) e os avaliaram para detecção de anticorpos IgG anti-*T. solium* em dois kits ELISA comerciais. Baixos valores de sensibilidade (Se) foram detectados para ambas as formas clínicas de NCC (viável e calcificada), sendo 44,4 % e 22,2 % para a forma viável e 6,7 % e 4,5 % para a calcificada. Além disso, apresentaram altos índices de reatividade cruzada com hidatidose (84,4 % e 55,6 %) e himenolepíase (11,1 % e 2,2 %). Estes resultados destacam a eficiência dos anticorpos IgY policlonais produzidos a partir do antígeno hidrofóbico de *T. crassiceps* para o imunodiagnóstico discriminatório da NCC, em comparação com a IgG humana.

Em estudo realizado por Machado et al. (2007), amostras de soros humanos foram testadas em grupos similares ao presente estudo (NCC positivos, saudáveis e outras parasitoses) e obtiveram desempenho diagnóstico inferior, com 92,5 % (Se) e 93,3 % (Es),

utilizando antígeno hidrofóbico de *T. solium*. Dentre as amostras testadas no grupo de outras parasitoses, aquelas de indivíduos infectados com *E. granulosus* apresentaram reatividade de 70 % (7/10). No presente estudo, apenas 20 % (1/5) das amostras de soro de *E. granulosus* reagiram, demonstrando a alta especificidade da IgY anti-FhTc. Gonçalves et al. (2010), testando amostras de soro com IgG humana anti-*T. solium* contra frações hidrofóbicas de *T. saginata*, obtiveram 95 % (Se) e 82,6 % (Es), apresentando reatividade cruzada no grupo de outras parasitoses (n = 45) em todas as amostras com infecção por *E. granulosus* (6/45) e três com *H. nana* (4/45). No presente estudo, apenas uma amostra com *E. granulosus* e uma com *H. nana* reagiram. Estes resultados denotam a eficiência e especificidade dos anticorpos IgY policlonais no imunodiagnóstico da NCC produzidos a partir do antígeno hidrofóbico de *T. crassiceps* em comparação com os anticorpos IgG humanos testados contra a fração hidrofóbica de *T. solium* e *T. saginata*.

6. CONCLUSÕES

Os anticorpos IgY policlonais produzidos a partir da imunização de galinhas com antígenos da fração hidrofóbica de *T. crassiceps* apresentaram elevado rendimento proteico no decorrer da atividade experimental. Os anticorpos obtidos durante oito semanas, a partir de quatro imunizações, foram eficientemente fracionados, purificados e caracterizados por imunoenaios ELISA indireto, apresentando elevado potencial de produção e avidéz. Além disso, apresentaram alto reconhecimento antigênico contra FhTc por meio dos imunoenaios *Western blotting* e RIFI. Os anticorpos IgY policlonais específicos anti-FhTc foram capazes de reconhecer antígenos em cortes histológicos de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps* pela reação de imunofluorescência indireta. Além disso, apresentaram alto desempenho diagnóstico na detecção de imunocomplexos formados por antígenos de *T. solium* e IgG em soros de indivíduos com NCC confirmada e na discriminação das formas ativa e inativa da doença.

Estes resultados demonstraram a aplicação potencial dos anticorpos IgY produzidos em galinhas por antígenos de *T. crassiceps* como uma ferramenta inovadora, de elevada rentabilidade, baixo custo de produção e alta eficiência no imunodiagnóstico da NCC humana.

7. REFERÊNCIAS

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 2, p. 207-214, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B)

AMRO, W.A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 99-103, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>

ARNON, T.I.; KAISER, J.T.; WEST JR.; A.P., OLSON; R.; DISKIN, R.; VIERTLBOECK, B.C.; GOBEL, T.W.; BJORKMAN, P.J. The crystal structure of CHIR-AB1: a primordial avian classical Fc receptor. **Journal of Molecular Biology**, v. 381, p. 1012–1024, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.06.082>

ARORA N.; TRIPATHI S.; KUMAR P.; MONDAL P.; MISHRA A.; PRASAD A. Recent advancements and new perspectives in animal models for neurocysticercosis immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, v. 39, p. 1-20, 2017.
<https://doi.org/10.1111/pim.12439>

BANSAL, R.; GUPTA, M.; BHARAT; V.; SOOD, N.; AGARWAL, M. Racemose variant of neurocysticercosis: a case report. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 40, p. 1-4, 2014.
[10.1007/s12639-014-0493-8](https://doi.org/10.1007/s12639-014-0493-8)

BARCELOS, I. S.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine International Health**, v. 6, p. 219-226, 2001.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00701.x>

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 849–860, 2001.
<https://doi.org/10.1189/jlb.70.6.849>

BIONDI, G.F.; MUCCILOLO, R.G.; NUNES, C.M.; RICHTZENHAIN, L.J. Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing a heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 261–266, 1996.
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)00928-0](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00928-0)

BOLLEN, L.; HAU, J. Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and immunospecific antibody response in serum and corresponding egg yolk. **In Vivo (Athens Greece)**, v. 11, p. 395–398, 1996.

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

BORGES I.P.; SILVA M.F.; SANTIAGO F.M.; FARIA L.S.; FERREIRA-JUNIOR, A.F.; DA SILVA R.J.; COSTA M.S.; DE FREITAS V.; YONEYAMA K.A.G.; FERRO E.A.V.; LOPES D.S.; RODRIGUES R.S.; DE MELO RODRIGUES, V. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 333-342, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178>

BRAMBELL, F.W.R. The transmission of passive immunity from mother to young. *In: Transmission of immunity in birds*. Elsevier Science Publishing Company, United States, v. 18, p. 20-41, 1970.

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

<https://doi.org/10.1590/S0004-282X2000000100003>

CAI, Y.C.; GUO, J.; CHEN, S.H.; TIAN, L.G.; STEINMANN, P.; CHEN, M.X.; LI, H.; AI, L.; CHEN, J.X. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, p. 385-390, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.008>

CALLACONDO, D.; GARCIA, H.H.; GONZALES, I.; ESCALANTE, D.; NASH, T.E. High frequency of spinal involvement in patients with basal subarachnoid neurocysticercosis. **Neurology**, v. 78, p. 1394-1400, 2012.

<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318253d641>

CARPIO, A.; ROMO, M. L.; PARKHOUSE, R. M. E.; SHORT, B; DUA, T. Parasitic diseases of the central nervous system: lessons for clinicians and policy makers. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 4, p. 401-414, 2016.

<https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1155454>

CARPIO, A.; FLEURY, A.; ROMO, M. L.; ABRAHAM, R. Neurocysticercosis: the good, the bad, and the missing. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 18, p. 289-301, 2018.

<https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1451328>

CDC. **Parasites-Cysticercosis**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/index.html>>. Acesso em: 02 jan. 2019.

CORAL-ALMEIDA, M.; GABRIËL, S.; ABATI, 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, p. 1-20, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003919>

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

<https://doi.org/10.1100/2012/159821>

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

<https://doi.org/10.1177/1941874414533351>

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

<https://doi.org/10.1007/s11910-015-0601-x>

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

<https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.177>

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

[https://doi.org/10.1016/0022-510X\(96\)00130-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(96)00130-X)

DEL BRUTTO, O.H.; NASH, T.E.; WHITE Jr., A.C; 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.

<https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.11.045>

FERREIRA-JUNIOR, A.; SANTIAGO, F. M.; SILVA, M. V.; FERREIRA, F. B.; MACEDO JUNIOR, A. G.; MOTA, C. M.; FARIA, M. S.; SILVA FILHO, H. H.; SILVA, D. A.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W. Production, characterization and applications for *Toxoplasma gondii*-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. **PLoS One**, v. 7, p. e40391, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040391>

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

<https://doi.org/10.1046/j.1360-2276.2003.01132.x>

FLEURY, A.; CARRILLO-MEZO, R.; FLISSER, A.; SCIUTTO, E.; CORONA, T. Neurocysticercosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, p. 123-133, 2011.

<https://doi.org/10.1586/eri.10.150>

FLORES-BAUTISTA, J.; NAVARRETE-PEREA, J.; FRAGOSO, G.; FLISSER, A.; SOBERÓN, X.; LACLETTE, J.P. Fate of uptaken host proteins in *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci. **Bioscience Reports**, v. 38, p. 1-10, 2018.

<https://doi.org/10.1042/BSR20180636>

FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, p. 969-990, 1962.

<https://doi.org/10.1139/z62-086>

GARCIA, H.H. Neurocysticercosis. **Neurologic Clinics**, v. 36, p.851-864, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.003>

GARCIA, H.H.; CASTILLO, Y.; GONZALES, I.; BUSTOS, J.A.; SAAVEDRA, H.; JACOB L.; DEL BRUTTO, O.H.; WILKINS P.P.; GONZALEZ A.E.; GILMAN, R.H. Low sensitivity and frequent cross-reactions in commercially available antibody detection ELISA assays for *Taenia solium* cysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 23, p. 101-105, 2018.

<https://doi.org/10.1111/tmi.13010>

GARCIA, H.H.; NASH, T.E.; DEL BRUTTO, O.H. Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. **The Lancet. Neurology**, v. 1, p. 1202–1215, 2014.

[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8)

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

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.001>

GAZARIAN, K.; ROWLAY, M.; GAZARIAN, T.; VAZQUEZ BUCHELLI, J.E.; HERNÁNDEZ GONZÁLES, M. Mimotope peptides selected from phage display combinatorial library by serum antibodies of pigs experimentally infected with *Taenia solium* as leads to developing diagnostic antigens for human neurocysticercosis.

Peptides, v. 38, p.381-388, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.021>

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.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000300008>

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. **Zeitschrift für Parasitenkunde**, v. 71, p. 273-276, 1985.

<https://doi.org/10.1007/BF00926279>

GRIPPER L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease – a review. **Acta Tropica**, v. 9, p. 218-224, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.015>

GRZYWA, R.; LUPICKA-SLOWIK, A.; WALCZAK, M.; IDZI, M.; BOBREK, K.; BOIVIN, S.; GAWEL, A.; STEFANIAK, T.; OLEKSYSZYN, J.; SIENCZYK, M. Highly sensitive detection of cancer antigen 15-3 using novel avian IgY antibodies. **ALTEX**, v. 31, p. 43-52, 2014.

<https://doi.org/10.14573/altex.1309181>

GUARDA, K. X.; COSTA-CRUZ, J. M.; BARCELOS, I. S. C. Seroprevalence of human cysticercosis in Jataí, Goiás state, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 146-149, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.01.002>

GUVEN, E.; DUUS, K.; LAURSEN, I.; HOJRUP, P.; HOUEN, G. Aluminum hydroxide adjuvant differentially activates the three complement pathways with major involvement of the alternative pathway. **PLoS One**, v. 8, p. 44-45, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074445>

HODEK, P.; TREFIL P.; SIMUNEK, J.; HUDECEK, J.; STIBOROVA, M. Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 113-124, 2013.

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

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000600008>

JANEWAY, C.A.; WALPORT, P.T.M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5^a ed. New York: **Garland Science**. 2001. p. 708.

JINTARIDTH, P.; SRISOMSAP, C.; VICHITTUMAROS, K.; KALPRAVIDH, R.W.; WINICHAGOON, P., FUCHAROEN, S.; JISNUSON SVASTI, M.R.; KASINRERK, W. Chicken egg yolk antibodies specific for the gamma chain of human hemoglobin for diagnosis of thalassemia. **International Journal of Hematology**, v. 83, p. 408-414, 2006.

<https://doi.org/10.1532/IJH97.A20515>

KIM, H.S.; LEE, B.; HAN, S.Y; JUNG, Y.T. Expression of bovine rotavirus VP8 and preparation of IgY antibodies against recombinant VP8. **Acta Virologica**, v. 61, p. 143-149, 2017.

https://doi.org/10.4149/av_2017_02_03

KOUSTED, T. M; KALLIOKOSKI, OTTO; CHRISTENSEN, S.K.; WINTHER, J.R.; HAU, J. Exploring the antigenic response to multiplexed immunizations in a chicken model of antibody production. **Heliyon**, v. 3, p. 1-19, 2017.

[10.1016/j.heliyon.2017.e00267](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00267)

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

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

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

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.282>

LARRALDE, C.; SOTELO, J.; MONTOYA, R.M.; PALENCIA, G.; PADILLA, A., GOVEZENSKY, T.; DIAZ, M.L.; SCIUTTO, E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.114, p. 926-928, 1990

LEE, W.; ATIF, A. S.; TAN, S.C.; LEOW, C.H. Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 71-85, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.05.001>

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

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.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01917.x>

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.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000300016>

MANHANI, M. N.; RIBEIRO, V. S.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific phage-displayed peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 322-329, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01283.x>

MAQUIEIRA, A.; BRUN, E.M.; GARCES-GARCIA, M.; PUCHADES, R. Aluminum oxide nanoparticles as carriers and adjuvants for eliciting antibodies from non-immunogenic haptens. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 9340–9348, 2012.

<https://doi.org/10.1021/ac3020998>

MARCQ, C.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Refinement of the production of antigen-specific hen egg yolk antibodies (IgY) intended for passive dietary immunization in animals. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment Journal**, v. 17, p. 483–493, 2013.

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

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.011>

MELO, A.L.; PINTO, H.A. Helintos. *In*: NEVES, et al. **Parasitologia Humana**. 16^a ed. Atheneu, São Paulo, 2016. p. 215-223.

MINCIULLO, P. L.; CASCIO A.; ISOLA, S.; GANGEMI, S. Different clinical allergological features of *Taenia solium* infestation. **Clinical em Molecular Allergy**, v. 14, p. 1-5, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12948-016-0056-x>

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p. 159-169, 2002.

<https://doi.org/10.1089/10966200260398198>

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

MOLINARI, J.L.; GARCIA-MENDOZA; DE LA GARZA, Y.; RAMIREZ, J.A.; SOTELO, J.; TATO, P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestodes excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 66, p. 777-781, 2002.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.777>

MULLER, S.; SCHUBERT, A.; ZAJAC, J.; DYCK, T.; OELKRUG, C. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 109-116, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3>

NOH, J.; RODRIGUEZ, S.; LEE, Y.M.; HANDALI, S.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.; GARCIA, H.H.; WILKINS, P.P. Recombinant protein - and synthetic peptide-based immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p.1429-1434, 2014.

<https://doi.org/10.1128/JCM.03260-13>

PERALTA, M.F.; MAGNOLI, A.; ALUSTIZA, F.; NILSON, A; MIAZZO, R; VIVAS, A. Gut-associated lymphoid tissue: a key tissue inside the mucosal immune system of hens immunized with *Escherichia coli* F4. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1-11, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00568>

RAMACHANDRAN, P.S.; WILSON, M.R. Diagnostic testing of neurologic infections. **Neurologic Clinics**, v. 36, p. 687-703, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ncl.2018.07.004>

RAPOSO, R.S.; SANTARÉM, V.A.; MERIGUETI, Y.F.F.B.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; CERAZO, L.M.L.; PEREIRA, L.; ZAMPIERI, B.P.; SILVA, A.V.; LAPOSY, C.B., Kinetic and avidity of IgY anti-*Toxocara* antibodies in experimentally infected chickens. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 33-41, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.09.009>

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

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.01.008>

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

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.08.011>

RIBEIRO, V. S.; GONZAGA, H. T.; NUNES, D.S.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Neurocysticercosis serodiagnosis: mimotope-based synthetic peptide as potential biomarker. **Parasitology Research**, v. 2019, p. 1-4, 2019.

<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06288-9>

RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. **Bull US Army Medicine Department**, v.8, p. 326-340, 1948.

ROCHA D.G.; FERNANDEZ J.H.; DE ALMEIDA C.M.C.; DA SILVA C.L.; MAGNOLI F.C.; DA SILVA O.É; SILVA, W.D. Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 17, p. 30–31, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.069>

RODRIGUEZ, S.; WILKINS, P.; DORNY, P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. **Pathogens and Global Health**, v. 106 p. 286-298, 2012.

<https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000048>

SAMOREK-PIERÓG, M.; KARAMON, J.; CENCEK, T. Identification and control of sources of *Taenia solium* infection – the attempts to eradicate the parasite. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 27-34, 2018.

<https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0004>

SATO, Y.; NISHIMICHI, N.; NAKANO, A.; TAKIKAWA, K.; INOUE, N.; MATSUDA, H.; SAWAMURA T. Determination of LOX-1-ligand activity in mouse plasma with a chicken monoclonal antibody for ApoB. **Atherosclerosis**, v. 200, p. 303-309, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.02.001>

SCHADE, R.; STAAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H., KOCH, G.; LARSSON, A.; POLIMANN, W.; REGENMORTEL, M.V.; L1 RIJKE, E.; SPIEIMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 24, p. 925-934, 1996.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals: ATLA**, v. 33, p. 129-154, 2005.

SCHNIERING, A.; SCHADE, R.; HIEPE, T. Development of an IgY-based assay for the detection of *Ascaris suum* antigens. **ALTEX**, v. 13, p. 62-65, 1996.

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. *In*: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chickens egg yolk antibodies, production and applications – IgY-Technology**. Springer-Verlag: Berlin, 2001.p. 255.

https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3

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

<https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2000.00567.x>

SILVA, A. V. M.; TAKAYANAGUI, O. M. Teníase e cisticercose – *In*: NEVES, et al. **Parasitologia Humana**. 16^a ed. Atheneu, São Paulo, 2016. p. 261-271.

SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 234-244, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028>

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.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.009>

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

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000400009>

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

<https://doi.org/10.1007/s12098-014-1576-3>

SINNREICH, M.; SHAW, C.A.; PARI, G; NALBANTOGLU, J.; HOLLAND, P.C.; KARPATI, G. Localization of coxsackie virus and adenovirus receptor (CAR) in normal and regenerating human muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 541-548, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.05.007>

SVENDSEN, A.C., OSTERGAARD L.H.; STODULSKI, G.; HAU, J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, v. 45, p. 89–93, 1995.

TAYLOR, A.I.; SUTTON, B.J.; CALVERT, R.A. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, p. 97–101, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.08.012>

TELLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-RONQUILLO. Epidemiology of neurocysticercosis and epilepsy, is everything described? **Epilepsy & Behavior**, v. 16, p. 525-550, 2017.

[10.1016/j.yebeh.2017.01.030](https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2017.01.030)

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

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000500007>

TORGERSON, P.R.; DEVLEESSCHAUWER, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; WILLINGHAM, A.L., KASUGA, F., ROKNI, M.B., ZHOU, X.N., FÈVRE, E.M.; SRIPA, B.; GARGOURI, N.; FÜRST, T.; BUDKE, C.M.; CARABIN, H.; KIRK, M.D.; ÂNGULO, F.J.; HAVELAAR, A.; DE SILVA, N. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 11 foodborne parasitic diseases, 2010: a data synthesis. **PloS Medicine**, v. 12, p.1-22, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001920>

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

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.354>

VARGAS-PARADA, L.; LACLETTE, J.P. Role of the calcareous corpuscles in cestode physiology: a review. **Revista Latinoamericana de Microbiologia.**, v.41, p. 303–307, 1999.

VIERTLBOECK, B.C.; SCHWEINSBERG, S.; HANCZARUK, M.A.; SCHMITT, R.; DU PASQUIER, L.; HERBERG, F.W.; GOBEL, T.W. The chicken leukocyte receptor complex encodes a primordial, activating, high-affinity IgY Fc receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 11718–11723, 2007.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0702011104>

VIERTLBOECK, B.C.; SCHMITT, R.; HANCZARUK, M.A.; CROOIJMANS, R.P.; GROENEN, M.A.; GOBEL, T.W. A novel activating chicken IgY FcR is related to leukocyte receptor complex (LRC) genes but is located on a chromosomal region distinct from the LRC and FcR gene clusters. **Journal of Immunology**, v. 182, p.1533–1540, 2009.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1533>

VILIBIC-CAVLEK, T.; BARBIC, L.; STEVANOVIC, V.; PETROVIC G.; MLINARIC-GALINOVIC, G. IgG avidity: an important serologic marker for the diagnosis of tick-borne encephalitis virus infection. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, p. 119–121, 2016.

<https://doi.org/10.5604/17331331.1197285>

XING, P.; SHI, Y.; DONG, C.; LIU, H.; CHENG, Y.; SUN, J.; LI, D.; LI, M.; SUN, K.; FENG, D. Colon-targeted delivery of IgY against *Clostridium difficile* toxin A and B by encapsulation in chitosan-Ca pectinate microbeads. **AAPS PharmSciTech.**, v. 18, p. 1095-1103, 2017.

<https://doi.org/10.1208/s12249-016-0656-2>

WANG, Z.Q.; FU, G.Y.; JING, F.J.; JIN, J.; REN, H.J.; JIANG, P.; CUI, J. Detection of *Trichinella spiralis* circulating antigens in serum of experimentally infected mice by an IgY-mAb sandwich ELISA. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p.727-733, 2012.

<https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1157>

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

<https://doi.org/10.1017/S0031182009991442>

WHO. **Taeniasis/cysticercosis**. Disponível em: < www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>. Acesso em: 2 jan. 2019.