

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Comparação de frações antigênicas de formas metacestódeas de *Taenia solium* com graus variados de hidrofobicidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose.

Vanessa da Silva Ribeiro

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Comparação de frações antigênicas de formas metacestódeas de *Taenia solium* com graus variados de hidrofobicidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose.

Vanessa da Silva Ribeiro

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

Msc. Gleyce Alves Machado
(Co- Orientadora)

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Comparação de frações antigênicas de formas metacestódeas de *Taenia solium* com graus variados de hidrofobicidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose.

Vanessa da Silva Ribeiro

Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa Cruz
ICBIM
(Orientadora)

Msc. Gleyce Alves Machado
(Co-Orientadora)

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em ___/___/___.

Prof^ª. Dr^ª. Vera Lucia de Campos Brites
(coordenadora)

Uberlândia - MG
Fevereiro- 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

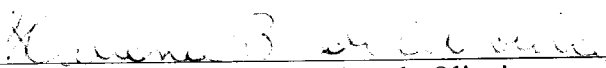
Comparação de frações antigênicas de formas metacestódeas de *Taenia solium* com graus variados de hidrofobicidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose.

Vanessa da Silva Ribeiro

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Profª. Drª. Julia Maria Costa Cruz

Profª. Drª. Fabiana Martins de Paula


Profª. Msc. Heliana Batista de Oliveira

Uberlândia, 15 de Fevereiro de 2007.

À meus pais, Antônio e
Cleuza, que sempre
acreditaram em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade oferecida, pelo dom da vida e por ter me dado força para seguir este caminho, aos meus pais, Antônio e Cleuza, que tanto acreditaram em meus objetivos e sempre lutaram para que estes fossem possíveis, pelo incentivo e amor dedicado, à minhas irmãs Rita e Érika e familiares que sempre torceram por mim e a distância me acompanharam, ao meu namorado Rogério, companheiro de todas as horas, pelo apoio e carinho.

Às queridas amigas de república, pelos tantos momentos que passamos juntas durante todo o curso.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Julia Maria Costa Cruz pelo exemplo de profissionalismo, orientações e apoio, à minha co-orientadora Gleyce Alves Machado, pela imensa ajuda, conhecimentos transmitidos, apoio e paciência, às funcionárias Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires e Maria das Graças Marçal e às colegas de laboratório: Ana Lúcia Ribeiro Gonçalves, Flávia de Assunção Gonçalves, Marianna Manhani Nascimento e Rosângela Maria Rodrigues por todos os momentos que passamos juntas, pela companhia e momentos de descontração.

Aos membros da banca examinadora: Prof^ª. Msc. Heliana Batista de Oliveira e Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Martins de Paula.

A todos os professores que me ajudaram a crescer com seus conhecimentos. À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este projeto e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Aspectos morfológicos	1
1.2 - Ciclo biológico de <i>T. solium</i> e infectividade	2
1.3 - Aspectos epidemiológicos	3
1.4 - Relação parasito – hospedeiro	5
1.4.1 - Ação patogênica	5
1.4.2 - Sintomatologia	7
1.5 – Diagnóstico	7
1.5.1 - Neuroimagem	8
1.5.2 - Anatomopatológicos	8
1.5.3 – Métodos imunológicos	8
1.6 – Utilização de antígenos purificados	9
2 – MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 - Comitê de ética em pesquisa	11
2.2 - Obtenção dos metacestódeos de <i>T. solium</i>	11
2.3 - Extratos antigênicos	11
2.3.1 - Líquido de vesícula	11
2.3.2 - Extrato salino de metacestódeos de <i>T. solium</i>	11
2.4 - Purificação do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (S) através de Triton X-114	11
2.5 - Análise do perfil eletroforético dos antígenos em SDS-PAGE 12%	12
2.6 - Coloração do gel por nitrato de prata	14
2.7 - Amostras de soro	14
2.8 - Testes ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de <i>T. solium</i>	15
2.9 - Normas de biossegurança	16
2.10 - Análise estatística	16
3 – RESULTADOS	17
3.1 - Concentrações protéicas dos antígenos totais (LV e S) e suas frações purificadas através do Triton X-114	17
3.2 - Análise do perfil eletroforético dos antígenos em SDS-PAGE 12%	17
3.3 - Testes ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de <i>T. solium</i>	18
4 – DISCUSSÃO	22
5 – CONCLUSÕES	26
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Aquosa
Agno ₃	Nitrato de prata
D	Detergente
DO	Densidade óptica
ED	Eficiência do diagnóstico
EITB	Enzyme-linked immunoelectro transfer blot assay
ELISA	Ezyme-linked immunosorbent assay
Fn	Falso negativo
Fp	Falso positivo
Grupo 1	Pacientes com NC
Grupo 2	Pacientes com infecção por outros parasitos
Grupo 3	Indivíduos aparentemente saudáveis
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IR	Índice de reatividade
IY	Índice Youden
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LV	Líquido de vesícula
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Neurocisticercose
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-T	PBS acrescido de Tween 20
RM	Ressonância magnética
RX	Demonstração radiológica
S	Extrato Salino
SNC	Sistema nervoso central
Ta	Temperatura ambiente
TC	Tomografia computadorizada
TX-114	Triton X-114
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
Vn	Verdadeiro negativo
Vp	Verdadeiro positivo

LISTA DE TABELAS

1 - Concentrações protéicas dos extratos totais e suas frações detergente e aquosa	17
2 - Reações cruzadas na sorologia por ELISA para NC com soros positivos para outras parasitoses	19
3 -Sensibilidade, especificidade, Eficiência de Diagnóstico (ED) e Índice Younden (IY) do líquido de vesícula e extrato salino total e suas respectivas frações detergente e aquosa	21

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Esquema do fracionamento do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino total (S) e de metacestódeos de *T. solium* e o perfil eletroforético dos respectivos antígenos e suas frações purificadas através de coloração pela prata em SDS-PAGE 12%. 13
- 2 - Perfis eletroforéticos dos extratos totais - líquido de vesícula (LV) e extrato salino (S) - e suas respectivas frações: detergente (DLV e DS) e aquosa (ALV e AS). 17
- 3 - Taxa de positividade do teste ELISA para os Grupos 1 (Neurocisticercose), 2 (Outras Parasitoses) e 3 (Saudáveis), para o líquido de vesícula e extrato salino total e suas respectivas frações detergente e aquosa 18
- 4 - ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro de pacientes com diagnóstico de NC (Grupo 1; n = 40), outras parasitoses (Grupo 2; n= 62) e indivíduos saudáveis (Grupo 3; n = 30) usando os extratos antigênicos salino e líquido de vesícula sem fracionamento (total), e suas respectivas fases: detergente e aquosa. 20

1 - INTRODUÇÃO

Várias espécies de tênias causam problemas à saúde humana sendo também responsáveis por significativas perdas econômicas na atividade pecuária. Na família Taeniidae, dois cestódeos importantes, *Taenia solium* e *Taenia saginata*, têm o homem como hospedeiro definitivo e, respectivamente o suíno e o bovino como hospedeiros intermediários (SASAKI; BRIOSCHI, 1997; PAWLOWSKI; ALLAN; SARTI, 2005a).

As tênias são popularmente conhecidas como “solitárias” devido ao fato dos indivíduos parasitados albergarem apenas um verme adulto no intestino que, em geral, pouco dano causam ao hospedeiro. Porém a cisticercose, resultado da infecção com as formas metacestódeas de *Taenia* sp, é que causa quadros patológicos, dependendo do número, tamanho e localização dos cisticercos (NASCIMENTO, 2003; FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006).

A teníase e a cisticercose são conhecidas desde a antiguidade, pensando-se durante muito tempo que se tratava de doenças causadas por espécies diferentes de parasitos, até que Küchenmeister, em 1885, demonstrou que a ingestão de carne suína contendo formas metacestódeas de *T. solium* dá origem à teníase no homem (NASCIMENTO, 2003).

A espécie *T. solium* é universalmente aceita como a única a ocasionar a cisticercose humana, resultado da ingestão de ovos deste parasito. Neste caso as formas metacestódeas podem acometer diversos órgãos e tecidos, tais como: olhos, músculos e sistema nervoso central (SNC) (WOODHOUSE; FLISSER, LARRALDE, 1982; FLISSER, 1988), estas formas podem também ser encontradas na glândula salivar (MAHAJAN; KHURANA; SETIA, 2007). A neurocisticercose (NC), patologia resultante da presença dos metacestódeos no SNC constitui a forma mais grave da cisticercose, sendo a principal causa de epilepsia nos países em desenvolvimento (PATEL; JHA; YADAV, 2006; VELASCO et al., 2006) e têm sido observada em associação á outras doenças e também á tumores (NIIZUMA et al., 2007).

1.1 - Aspectos morfológicos

O parasito *T. solium* pertence à Família Taeniidae (filo Platyhelminthes, classe Cestoidea, ordem Cyclophyllidea) e se caracteriza por ausência completa do aparelho digestivo, segmentação do corpo em proglotes dotadas cada uma de um sistema reprodutor hermafrodita; úteros em forma de tubos longitudinais ramificados, testículos numerosos e poros genitais situados em suas margens das proglotes com disposição irregular (REY, 2001).

O estágio adulto apresenta o corpo leitoso, levemente rosado, com comprimento médio de 1,5 a 4 metros. O escólex é piriforme e apresenta quatro ventosas e uma dupla coroa de acúleos, com número variando entre 25 a 50, inseridas em um rostro situado entre as ventosas. O estróbilo corresponde ao restante do parasito e possui aspecto de uma fita, composto por um grande número de segmentos, as proglotes, que variam de 800 a 900 por parasito e se desenvolvem a partir do colo, estas apresentam diferentes estágios de desenvolvimento: jovens, maduras e grávidas. Decorridos três a quatro meses de infecção, as proglotes grávidas, constituem-se em verdadeiros sacos de ovos, contendo em média 60.000 ovos cada (REY, 2001; GARCIA et al., 2003).

Os ovos, quando examinados ao microscópio óptico, medem aproximadamente 30 a 45 µm de diâmetro, são esféricos e de aspecto radial, envoltos por uma espessa membrana protetora denominada embrióforo, em cujo interior encontra-se um embrião hexacanto provido de três pares de acúleos, também denominado de oncosfera (SCIUTTO et al., 2000). São bastante resistentes, podendo permanecer viáveis por mais de oito meses sob condições ambientais adequadas (locais quentes e úmidos), aumentando assim os riscos de transmissão (PÊSSOA; MARTINS, 1982; HOBERG, 2002).

As formas metacestódeas constituem-se de uma vesícula ovóide, translúcida, com aproximadamente 15 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, apresentando no seu interior, líquido vesicular e um escólex invaginado. O líquido vesicular é claro e composto por água, sais minerais, proteínas, uréia, creatinina, ácido úrico, além de colesterol e glicose (PÊSSOA; MARTINS, 1982). O cisticerco pode apresentar-se sob duas formas: a cística, vesícula contendo escólex em seu interior, conhecida como *Cysticercus cellulosae* (Malpighi, 1697) e, em cachos com numerosas vesículas, mas sem o escólex, denominada *Cysticercus racemosus* (Zenker, 1822) - forma racemosa (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001). Os metacestódeos invaginados podem permanecer assim por mais de 30 anos, embora o tempo médio de vida seja estimado entre cinco a sete anos, quando então começam a se degenerar e morrer (PÊSSOA; MARTINS, 1982).

1.2 - Ciclo biológico de *T. solium* e infectividade

O ciclo biológico é heteroxênico, no qual o homem se infecta através da ingestão de carne suína, crua ou mal cozida, contendo formas metacestódeas viáveis de *T. solium*. Após três ou quatro meses, a tênia alcança a maturidade e os pacientes começam a eliminar as primeiras proglotes juntamente com as fezes, em número de dois a cinco segmentos, duas a

três vezes por semana. Ocasão na qual o helminto mede aproximadamente dois metros de comprimento (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003).

Os suínos atuam como hospedeiros intermediários e se infectam pela ingestão de alimentos contaminados com ovos ou proglotes grávidas. Os ovos (embrióforos), uma vez no estômago ou intestino delgado destes animais, pela ação dos sucos digestivos e da bile, que agem na substância cementante de sua parede, se rompem liberando o embrião hexacanto (oncosfera). O embrião hexacanto penetra na mucosa do estômago ou intestino delgado, é carregado pelo sangue aos diversos órgãos e tecidos e, em seguida sofre um processo de vesiculação se desenvolvendo na forma larvária, denominada metacestódeo ou cisticerco, [*Cysticercus cellulosae* (Malpighi, 1697)] em 9 a 14 semanas este é composto de um conteúdo fluido e um escólex invaginado com quatro ventosas, em rostro e sua dupla fileira de acúleos (REY, 2001).

Quando o homem se alimenta de carne suína contendo cisticercos, estes sob a ação da bile desenvagam o escólex, se fixam à mucosa e se desenvolvem em uma tênia adulta que passa a habitar o intestino humano (CARPIO, 2002). O homem pode se tornar hospedeiro intermediário acidental e adquirir a cisticercose por: heteroinfecção – que se dá pela ingestão de alimentos ou água contendo ovos de *T. solium* disseminados pelo paciente com teníase: auto-infecção interna - em consequência de movimentos antiperistálticos ou de vômitos, algumas proglotes grávidas podem alcançar o estômago onde sofrem ação dos sucos digestivos, o que permite a eclosão das oncosferas; ou também pela auto-infecção externa - em que o próprio portador da tênia, ingere os ovos de *T. solium* que ele alberga em consequência dos maus hábitos higiênicos e a eventualidade de levar as mãos à boca (REY, 2001).

1.3 - Aspectos epidemiológicos

Somente o homem tem sido encontrado com infecção natural por este helminto, ainda que experimentalmente tenha sido possível infectar algumas espécies de primatas, além de haver relatos de sucesso na infecção experimental de hamsters imunossuprimidos (ALLAN et al., 1991). O parasito adulto pode viver de 20 a 25 anos no intestino delgado do homem, aumentando assim a disseminação de ovos pela contaminação de água e alimentos (HOBERG, 2002). No entanto, Garcia et al. (2003), sugeriram um tempo de vida menor, provavelmente menos que cinco anos.

Estima-se que, anualmente, 50 milhões de pessoas são infectadas pela cisticercose no mundo, com 50.000 mortes (EDDI; NARI; AMANFU, 2003). Na América Latina, calcula-se

que a taxa de prevalência de NC e lesões oculares é de 100 e 30 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, atingindo cerca de 350.000 pessoas (PINTO et al., 2002). A enfermidade foi encontrada em 17 países latino-americanos, com maiores taxas de morbidade no Brasil, Chile, Peru, El Salvador, Guatemala e México, tendo maior frequência em áreas rurais (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

A cisticercose acomete milhares de indivíduos nos países menos desenvolvidos (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; MEDINA et al., 2005) e em países desenvolvidos com alta taxa de imigração de áreas endêmicas (SCHANTZ; WILKINS; TSANG, 1998; WHITE Jr, 2000; DeGIORGIO; PIETSCH-ESCUETA; TSANG, 2005), emergindo como um sério problema na agricultura e na saúde pública em vários países (WILLINGHAM; ENGELS, 2006).

Os fatores que contribuem para a natureza endêmica do complexo teníase/cisticercose são vários, mostrando estreita relação de dependência com os hábitos de higiene pessoal, familiar ou ambiental (AGAPEJEV, 2003; FLISSER; RODRIGUEZ-CANUL; WILLINGHAM, 2006). Estudos epidemiológicos concluem que a maior fonte de contaminação é a direta (pessoa a pessoa: manipuladores de alimentos, convivência, etc.), mudando o conceito clássico de que o meio ambiente é a maior fonte de contaminação com ovos destes cestódeos (GILMAN et al., 2000).

Viver com portadores de *T. solium* é um fator de risco particularmente alto para se infectar com os ovos da tênia (SCHANTZ; WILKINS; TSANG, 1998). Estudos mostraram que pessoas em contato com pacientes com NC têm três vezes mais risco de sorologia positiva para cisticercose que a população geral (GOODMAN; BALLAGH; CARPIO, 1999).

Incidência de cisticercose em estudos soropidemiológicos de acordo com levantamento realizado por Agapejev (2003), não considerando as comunidades indígenas, varia de 0,68 - 6,2%, sendo mais frequente em hospitais psiquiátricos (38,5%) que na população geral estudada (0,8% em crianças e 2,3% em adultos). Em comunidades indígenas, a incidência de cisticercose é 29,4% .

No Brasil, a neurocisticercose é encontrada com elevada frequência nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás sendo que as crianças são menos afetadas que adultos presumivelmente por causa de seu pequeno tempo de exposição e/ou diferenças na resposta imune. (DEL BRUTTO; SOTELO; ROMAN, 1998). A prevalência populacional, contudo, não é conhecida pela ausência de notificação da doença (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Não considerando as diferenças regionais, a incidência de NC nos diversos serviços de Neurologia e Neurocirurgia do Brasil, incluindo os hospitais gerais, varia de 0,03 a 13,4% nos

estudos clínicos, e de 0,12 a 9% em necrópsias. Exclusivamente nos hospitais gerais, a frequência observada de NC é $1,94 \pm 2,03\%$, mostrando o menor valor (0,19%) no estado de São Paulo e o maior (4,8%) no estado do Paraná. Em hospitais psiquiátricos do estado de Minas Gerais, a frequência de NC corresponde a 12,2% (AGAPEJEV, 2003).

Em Uberlândia, Minas Gerais, Costa-Cruz et al. (1995) investigaram a prevalência de cisticercose humana através de 3.937 ocorrências de necropsias no período de 1971 a 1993 no serviço de anatomia patológica do Hospital de Clínicas da Fundação de Assistência, Estudo e Pesquisa de Uberlândia. A análise de 2.862 registros de laudos que estavam completos e com idade acima de um ano revelou 39 casos (1,4%) de cisticercose. Com relação à procedência, 82,1% eram do Estado de Minas Gerais, 15,4% de Goiás e um caso (2,5%) não foi possível identificação. Dos 39 casos 35 (89,7%) apresentaram comprometimento do SNC, isolado ou associado a outras formas clínicas da doença, nove revelaram a forma cardíaca (isolada ou associada), em quatro a forma muscular (isolada ou associada) e em quatro a forma visceral (isolada ou associada). Os dados obtidos ainda informaram que em sete casos (17,9%) a cisticercose foi a causa básica do óbito.

Um estudo realizado por Silveira-Lacerda et al. (2002) em quatro cidades do Triângulo Mineiro constatou a soroprevalência da cisticercose em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre de Minas (4,8%) e Uberlândia (4,7%), demonstrando assim a endemicidade da cisticercose na população amostrada e a problemática do complexo teníase-cisticercose na região.

Embora os fatores que se relacionam com a endemicidade do complexo teníase-cisticercose sejam conhecidos, há pouco conhecimento sobre o impacto de estratégias de controle. Recentemente, foram investigados, por simulações através de modelos matemáticos, os efeitos de três grupos de intervenções de controle (KYVSGAARD; JOHANSEN; CARABIN, 2007), porém, há a necessidade de aprimoramento de técnicas para melhorar o controle destas doenças.

1.4 - Relação parasito - hospedeiro

1.4.1 - Ação patogênica

A penetração das oncosferas no organismo humano não é acompanhada de manifestações clínicas talvez por ser pequeno o número de larvas que empreendem sua migração através da parede intestinal. Alcançando o ponto de fixação o parasito começa seu processo patogênico pela compressão mecânica e deslocamento de tecidos e estruturas.

decorrentes da localização e crescimento do cisticerco e o processo inflamatório que geralmente envolve o parasito e pode estender-se a estruturas vizinhas (REY, 2001).

O cisticerco passa por vários estágios: vesicular – fase inicial quando cisticercos viáveis têm uma inflamação mínima associada; coloidal - com a perda da habilidade de controle da resposta imune do hospedeiro pelo cisticerco, sua parede é infiltrada e rodeada por células inflamatórias do hospedeiro, compostas primariamente por células mononucleares, que também podem entrar no fluido do cisticerco. Esta resposta inflamatória é associada com a elaboração de citocinas (RESTREBO et al., 1998); granular nodular - ocorre colapso de sua cavidade e fibrose devido ao progresso da resposta imune; estágio calcificado - eventualmente o parasito é substituído por fibrose progressiva, que pode calcificá-lo (WHITE Jr, 2000).

A forma metacestódea pode persistir no hospedeiro humano por longos períodos, em muitos casos por anos, sem licitar uma reação inflamatória. Em contraste a resposta inflamatória ao redor de um ou mais metacestódeos degenerados pode principiar uma doença sintomática (CARPIO, 2002). Há um equilíbrio parasito – hospedeiro que é mantido como resultado da habilidade do parasito sobreviver no hospedeiro por longos períodos (GROGL; ESTRADA; MACDONALD, 1985).

A patologia, a clínica e a resposta imunológica ao parasito estão relacionadas e dependem tanto da localização, do número, do tamanho e da fase de desenvolvimento em que se encontram os cisticercos, como da reação dos tecidos parasitados (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998; WHITE Jr, 2000; DEL BRUTTO, 2005). Na resposta humoral, há predominância de imunoglobulinas G (IgG), aumento menos acentuado de IgE e IgM no soro de pacientes e uma inflamação do tipo celular, crônica, com numerosos linfócitos e plasmócitos (REY, 2001; NASCIMENTO, 2003). Na NC clinicamente severa, cisticercos colapsados e necróticos são encontrados rodeados por um infiltrado celular proeminente. Algumas lesões mostram vários linfócitos e células do plasma, macrófagos, células gigantes multinucleadas e poucos eosinófilos, há também edema significativo e áreas de necrose tissular (SCIUTTO et al., 2000).

O conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos na relação parasita-hospedeiro tem auxiliado na compreensão da patogenia desta parasitose humana. Por conseqüência, esse conhecimento tem colaborado no desenvolvimento de testes imunológicos para o diagnóstico laboratorial desta doença (VAZ, 2001).

1.4.2 - Sintomatologia

A cisticercose caracteriza-se por não possuir uma sintomatologia própria ou um quadro clínico único que a distinga, sendo uma doença polimorfa, com diversos quadros clínicos e apresentando sérias dificuldades para o diagnóstico etiológico (REY, 2001).

Um cisticerco ativo, quando localizado no tecido cerebral, é responsável por manifestações clínicas extremamente variáveis. Parasitos mortos podem induzir resposta inflamatória intensa associada à convulsões epiléticas (apresentação mais comum da NC), que geralmente representam a manifestação primária da doença, ocorrendo em 50-80% dos pacientes com cisticercos no parênquima cerebral ou calcificações (DEL BRUTTO et al., 1992; WHITE Jr, 1997b; DEL BRUTTO; SOTELO; ROMAN, 1998; DEL BRUTTO et al., 2001; GARCIA et al., 2003).

O edema em decorrência da resposta imunológica à forma metacestódea pode levar ainda à sintomas como aumento da pressão intracraniana, dores de cabeça, náuseas e vômitos. Os metacestódeos podem viver no paciente infectado por anos e podem se calcificar (BARRY; KALDJIAN, 1993).

1.5 - Diagnóstico

O diagnóstico da neurocisticercose é baseado geralmente na combinação de dados clínicos, epidemiológicos, radiológicos e sorológicos (CHUNG et al., 1999; HUBERT et al., 1999; HAWK et al., 2005). Ressonância Magnética (RM) e/ ou Tomografia Computadorizada (TC) são as ferramentas de diagnóstico mais sensíveis e específicas. Entretanto, devido a seu alto custo e disponibilidade restrita, eles podem ser limitados ao uso nos países em desenvolvimento e com altas taxas de infecção. As manifestações clínicas não são específicas e não há um método fácil de se confirmar o diagnóstico de NC (YANCEY; DIAZ-MARCHAN; WHITE, 2005).

O critério padrão ou absoluto para o diagnóstico de NC inclui (i) demonstração histológica do parasito em biópsia ou material de operação, (ii) evidência de lesões císticas mostrando o escólex em Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética e (iii) visualização fundoscópica do parasito em casos de NC intraocular (DEL BRUTTO et al., 1996).

Na prática clínica, critérios absolutos não estão disponíveis na maioria dos casos e um diagnóstico provável deve depender de diferentes técnicas mais indiretas (DEL BRUTTO et al., 1996 WHITE Jr, 1997a).

1.5.1 – Neuroimagem

Uma vez que o número, tamanho, viabilidade e localização das lesões são de fundamental importância, os exames de imagem representam importante papel no diagnóstico da NC. A demonstração radiológica (RX) é realizada pelo encontro de imagens dos nódulos calcificados, com aspecto mais ou menos característico (REY, 2001). A tomografia computadorizada e ressonância magnética permitem a visualização de estruturas do parasito e do processo reacional do hospedeiro. Embora os resultados destes exames de imagens sejam tão importantes no diagnóstico da NC, a TC e a RM ainda são inviáveis para a maioria da população devido ao seu alto custo financeiro (VAZ, 2001; CHAWLA et al., 2002; GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; GARCIA et al., 2003).

1.5.2 – Anatomopatológicos

Os nódulos subcutâneos, eventualmente encontrados nos pacientes, permitem que se proceda facilmente a uma biópsia, assim o exame do cisticerco ao microscópio permite o exame histopatológico. A confirmação de cisticercose subcutânea é elemento da maior importância no esclarecimento dos casos neurológicos (REY, 2001).

1.5.3 – Métodos imunológicos

Ensaio para detectar antígenos do parasito, assim como anticorpos, poderiam potencialmente melhorar o diagnóstico pelo fato dos resultados serem positivos apenas com a infecção ativa. Um achado de eosinófilos no fluido cefalorraquidiano sugere o diagnóstico de neurocisticercose. Fixação de complemento, hemoaglutinação indireta, ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e EITB (*enzyme-linked immunoelectro transfer blot assay*) estão entre os ensaios de imunodiagnóstico que têm sido desenvolvidos (FLEURY et al., 2003).

A detecção de antígenos também é utilizada para o diagnóstico da cisticercose (NGUEKAM et al., 2003), hoje, EITB e ELISA são os testes mais frequentemente usados no diagnóstico desta doença. Apesar de o EITB ser aceito como o melhor diagnóstico imunológico disponível, o teste ELISA continua a ser usado extensivamente para fins epidemiológicos (SCHANTZ; WILKINS; TSANG, 1998; WILKINS et al., 2002; PRESTES-CARNEIRO et al., 2006).

O teste ELISA para detecção de antígeno é uma ferramenta eficiente para o acompanhamento do tratamento de pacientes com NC, pois o antígeno circulante não é mais detectado no soro de pacientes curados após um a três meses de tratamento (DORNY;

BRANDT; GEERTS, 2004). No entanto, não há evidências de que o teste ELISA para detecção de antígenos seja melhor que o teste ELISA para detecção de anticorpos (ITO; CRAIG, 2004; MONTEIRO; PINTO; DIAS, 2006).

Nos últimos anos vários pesquisadores têm testado novas técnicas para diagnosticar a NC: Parija et al. (2004) utilizaram o teste de co-aglutinação (CO-A) para detecção de antígenos de metacésteos de *T. solium* na urina de pacientes com NC, encontrando sensibilidade e especificidade moderadas, Lee et al (2005) testaram uma proteína de 10 kDa recombinante de *T. solium* expressada em uma bactéria para diagnosticar a esta doença por *immunoblot* e Ferrer et al (2007) utilizaram insertos de cDNA clonados e purificados para detecção de NC ativa através do teste ELISA com amostras de soro e LCR, obtendo alta sensibilidade e especificidade.

No Brasil, Costa et al. (1982) introduziram o ELISA para pesquisa de anticorpos IgG, utilizando três antígenos da forma metacéstea de *T. solium* (líquido de vesícula, extrato salino e extrato alcalino) em amostras de LCR (líquido cefalorraquidiano), relatando índices de sensibilidade e especificidade próximos a 100%.

O uso de diferentes extratos antigênicos da forma metacéstea de *T. solium* (extrato salino total, líquido de vesícula e extrato alcalino total) resultam em diferenças significantes nos testes imunológicos (COSTA, 1986).

1.6 – Utilização de antígenos purificados

Ensaio para detecção de anticorpos particularmente aqueles baseados em glicoproteínas do parasito purificadas ou fracionadas são altamente específicos (perto de 100%) e sensíveis (PAWLOWSKI, ALLAN; MEINARD, 2005b). Peptídeos purificados ou sintéticos estão sendo considerados excelentes candidatos a antígenos para o uso em testes imunológicos pela alta sensibilidade e especificidade, com mínimas reações cruzadas com outros protozoários ou helmintos (GEVORKIAN et al., 1996; SATO et al., 2003; FERRER et al., 2005).

Através de extração com Triton X-114 (TX-114) alguns autores têm demonstrado ótimos resultados e ressaltado esta metodologia como bastante promissora e eficiente na purificação de proteínas (BRICKER et al., 2001; CHATURVEDI; GUPTA, 2001). Após a purificação de frações antigênicas se torna mais acessível a produção de peptídeos sintéticos, que além de aumentar a sensibilidade, especificidade e o sinal da reação, solucionam o problema da dificuldade de obter o parasito para a produção dos extratos antigênicos (HANCOCK et al., 2003).

Quanto ao imunodiagnóstico da NC, embora amostras de LCR apresentem excelente utilidade em relação à amostras de soro, como observado por Macedo et al. (2002), a colheita de LCR é um procedimento invasivo que requer profissional especializado em local adequado. Contudo, a utilização de amostras de soro em testes com extratos totais tem apresentado baixos índices de especificidade. Por isso, a detecção de anticorpos específicos, em amostras de soro de pacientes com suspeita de NC representa importante área diagnóstica onde a padronização de testes utilizando antígenos purificados deve contribuir em estudos soroepidemiológicos e no auxílio diagnóstico da NC.

Este trabalho teve como objetivos:

- Purificação do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (S) das formas metacestódeas de *T. solium* por hidrofobicidade através do uso do Triton X-114 para obtenção das frações: detergente (D) e aquosa (A);
- Análises das amostras de soro de pacientes com diagnóstico de NC, outras parasitoses e saudáveis, frente aos antígenos obtidos através do teste imunológico ELISA;
- Comparação de frações antigênicas de formas metacestódeas de *T. solium* com graus variados de hidrofobicidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Comitê de ética em pesquisa

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

2.2 - Obtenção dos metacestódeos de *T. solium*

Os metacestódeos de *T. solium* foram retirados por dissecação, dos músculos esqueléticos de suínos naturalmente infectados, lavados quatro vezes em solução salina (NaCl, 0,15 M) e armazenados em lotes de 50 unidades a -20°C .

2.3 - Extratos antigênicos

2.3.1 - Líquido de vesícula

O líquido de vesícula dos metacestódeos de *T. solium* foi obtido por rompimento dos metacestódeos íntegros, centrifugados a $4.800\times g$ por 15 minutos a 4°C , distribuído em alíquotas e mantido a -20°C até o uso.

2.3.2 - Extrato salino de metacestódeos de *T. solium*

O extrato salino de metacestódeos de *T. solium* foi preparado a partir de 50 metacestódeos íntegros ou rompidos de acordo com Costa (1986). Estes foram então ressuspendidos em 5 ml de água destilada, submetidos ao homogeneizador de tecidos (Glas Col[®], USA) a 4°C por 5 ciclos de um minuto cada, e posteriormente submetidos a 4 ciclos de 30 segundos cada de ultra-som (Thornton, Impec Eletrônica São Paulo, Brasil) a 40 KHz em banho de gelo. A isotonização foi feita com 5 ml de solução NaCl 0,3M e mais três ciclos de ultra-som, agitou-se a mistura lentamente a 4°C , centrifugou-se a $12.400\times g$ (Du Pont Sorvall[®] Products Newton, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4°C , o sobrenadante constituiu o extrato salino. A dosagem protéica foi realizada segundo Lowry et al. (1951), adotando como padrão a soroalbumina bovina (Sigma Chen. Co, St. Louis - MO, USA). Posteriormente o antígeno foi dividido em alíquotas e conservado a -20°C .

2.4 - Purificação do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (S) através de Triton X-114

2.6 - Coloração do gel por nitrato de prata

A coloração do gel por nitrato de prata (AgNO_3) foi realizada de acordo com Friedman (1982), na qual os polipeptídeos se destacam em tons de amarelo-ferrugem. Mergulhou-se o gel após a migração das proteínas, em solução fixadora [metanol 50% (Merck), ácido acético 12% (Merck), formaldeído 0.05% (Vetec) e água destilada] por uma hora, e em seguida este foi submetido a três banhos, em etanol (Merck) 50%, 10 minutos cada, e a um pré-tratamento com solução de tiosulfato de sódio penta-hidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 0,02% (Merck) por 1 minuto. O gel foi lavado três vezes por 20 segundos cada em água destilada, impregnado com solução de formaldeído 0,04% acrescida de nitrato de prata (AgNO_3) 2% e mantido em câmara escura por 20 minutos. Em seguida lavado três vezes em água destilada por 20 segundos cada e revelado em solução de carbonato de sódio anidro 0,05% de formaldeído e 2% de tiosulfato de sódio penta-hidratado 0,02% (Merck) até o surgimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com solução de metanol 50% e ácido acético 10%. O gel foi estendido entre folhas de papel celofane, embebidas em água destilada, sobre uma placa de vidro onde permaneceram por 24 horas para secar. As proteínas evidenciadas foram comparadas aos padrões de peso moleculares e seus valores foram estimados.

2.7 - Amostras de soro

As amostras de sangue foram colhidas no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, por punção venosa, e enviadas para o Laboratório de Parasitologia da UFU, para posterior obtenção do soro por centrifugação. As amostras de soro foram divididas em alíquotas, identificadas e conservadas a -20°C .

As amostras de soro padrão positivo, foram obtidas de dois pacientes com diagnóstico confirmado de NC através de tomografia computadorizada, testes imunológicos, história clínica e dados epidemiológicos do próprio paciente. As três amostras de soro padrão negativo, constituíram de indivíduos aparentemente saudáveis e que foram negativos, para *Taenia* sp e outros parasitos intestinais, em três exames parasitológicos de fezes pelo método HPJ (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934) e sem histórico de teníase-cisticercose.

O Grupo 1, foi constituído de obtidas 40 amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo de NC de acordo com critério de Del Brutto et al.(1996), com faixa etária de 10 a 60 anos, dentre estes, 22 eram do sexo masculino e 18 do feminino. O Grupo 2 se constituiu de 62 amostras de pacientes com outras parasitoses [*Taenia* sp (10), *Schistosoma mansoni* (10), *Ascaris lumbricoides* (6), *Hymenolepis nana* (4), *Strongyloides stercoralis* (4), *Tricuris*

trichiura (2), *Enterobius vermicularis* (6), Ancilostomídeo (6), hidatidose por *Echinococcus granulosus* (10) esta última já disponível no banco de soro do Laboratório de Cisticercose]. com faixa etária de 07 a 70 anos, sendo 19 do sexo masculino, 25 do feminino e 18 amostras não possuíam a informação quanto ao sexo e idade do paciente, uma vez que estas foram doadas por outros laboratórios. As 30 amostras de indivíduos assintomáticos (estudantes e seus familiares) que em 3 exames pelo método HPJ, foram negativos para parasitos intestinais e não possuíam histórico de teníase-cisticercose, constituíram o Grupo 3, com distribuição etária entre 02 e 41 anos, sendo 8 do sexo masculino e do 22 feminino.

2.8 - Testes ELISA para detecção de IgG anti-metacestódeo de *T. solium*

O teste ELISA utilizando LV, S e suas respectivas frações purificadas detergente (D) e aquosa (A), foi realizado de acordo com Costa (1986), com algumas modificações. Testes preliminares foram conduzidos para determinar as condições ótimas do teste ELISA através da titulação em bloco dos reagentes (antígeno, soro e conjugado). Placas de poliestireno (Interlab, São Paulo, Brasil), foram sensibilizadas com 50µl/poço de solução de extratos antigênicos na concentração de 10µg/ml de proteínas em tampão carbonato-bicarbonato (0.06M pH 9.6) e mantidas a 4°C por 18 h, em câmara úmida. Após três lavagens de 5 minutos cada, com PBS pH 7,2 adicionado de Tween 20 a 0.05% (PBS-T) adicionou-se 50µl das amostras de soro a serem testadas incluindo duas amostras de soro padrão positivo e três de padrão negativo, sendo todas na diluição de 1:200 em PBS-T. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C, após três lavagens por 5 minutos cada com PBS-T, foi acrescido 50 µl do conjugado IgG (fração Fc específica - Sigma), marcado com peroxidase diluído no título ideal de 1:1000 em PBS-T. As placas foram incubadas por 45 minutos a 37°C em câmara úmida, e lavadas três vezes por 5 minutos cada com PBS-T. A reação foi revelada com 50 µl do substrato H₂O₂ e solução cromógena de orto-fenilenodiamina (Merck) – OPD [5mg OPD + 12,5 ml de tampão citrato fosfato pH 5 + 5µl de H₂O₂ 3%]. A interrupção da reação após 15 minutos se deu pela adição de 25µl de solução de H₂SO₄ 2N (Merck).

A densidade óptica (DO) foi determinada pela leitura a 492 nm em leitor de ELISA (Titertek Plus, Flow Laboratories, USA). O *cut-off*, ou limiar de reatividade, foi calculado pela média das DOs das três amostras padrão negativo acrescidas de dois desvios padrão (BASSI et al., 1991). O Índice de Reatividade (IR), foi calculado pela divisão do valor das DOs pelo valor do *cut-off* para cada extrato antigênico (PARDINI et al., 2002). Foram consideradas positivas as amostras com IR>1.

3 - RESULTADOS

3.1 – Concentrações protéicas dos antígenos totais (LV e S) e suas frações purificadas através do Triton X-114

A Tabela 1, mostra a concentração protéica dos extratos totais – líquido de vesícula (LV) e extrato salino (S) e suas respectivas frações purificadas – detergente (D) e aquosa (A).

Tabela 1 - Concentrações protéicas dos extratos totais e suas frações detergente e aquosa.

Antígeno	Frações		
	Total	Detergente	Aquosa
Líquido de vesícula	5.000 µg/ml	1.000 µg/ml	2.800 µg/ml
Extrato salino	2.000 µg/ml	2.000 µg/ml	1.700 µg/ml

3.2 - Análise do perfil eletroforético dos antígenos em SDS-PAGE 12%

As amostras antigênicas foram testadas em SDS-PAGE 12%, a Figura 2 mostra os perfis eletroforéticos dos antígenos totais e suas frações purificadas após coloração do gel pela prata.

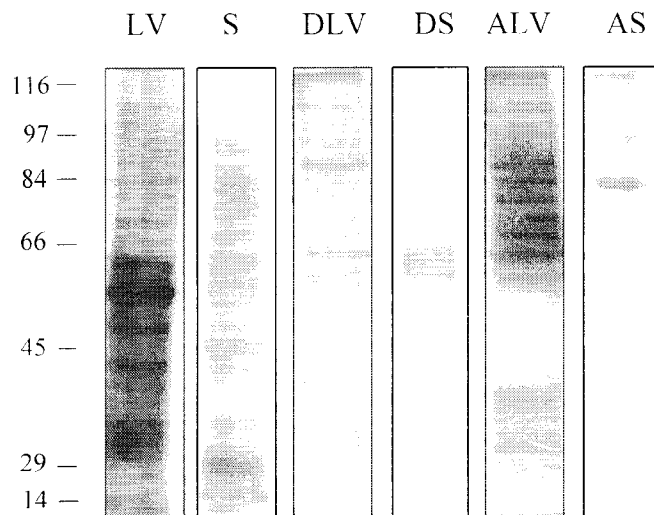


Figura 2 - Perfis eletroforéticos dos extratos totais - líquido de vesícula (LV) e extrato salino (S) - e suas respectivas frações: detergente (DLV e DS) e aquosa (ALV e AS).

As frações protéicas expressas foram: líquido de vesícula total - 121, 99, 90, 58, 45, 33, 24 e 22 kDa; fração detergente do líquido de vesícula - 121, 91 e 61 kDa, fração aquosa do

líquido de vesícula - 116, 91, 68, 58, 33 e 24 kDa; fração detergente do extrato salino - 50 - 70 kDa e fração aquosa do extrato salino - 116, 110, 97 e 77 kDa.

O fato dos perfis dos extratos totais serem diferentes de suas frações permite dizer que a purificação aconteceu.

3.3 - Testes ELISA para detecção de IgG anti-metacésteo de *T. solium*

A Figura 3 mostra a positividade das amostras por grupo para cada extrato antigênico no teste ELISA

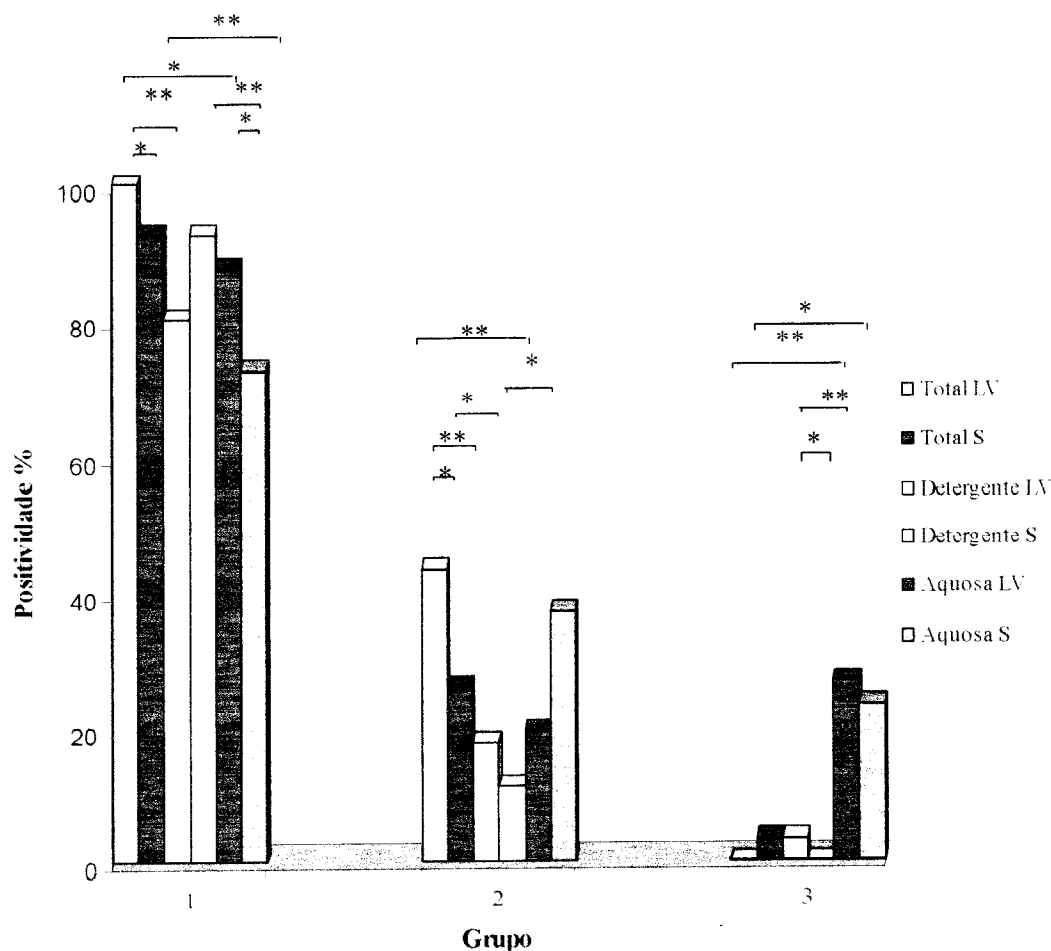


Figura 3 - Taxa de positividade do teste ELISA para os Grupos 1 (Neurocisticercose), 2 (Outras Parasitoses) e 3 (Saudáveis), para o líquido de vesícula e extrato salino total e suas respectivas frações detergente e aquosa. Diferenças estatísticas entre os grupos: *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

No Grupo 1, 100% (40/40) das amostras foram positivas para o líquido de vesícula total, 80% (32/40) para sua fração detergente e 87,5 % (35/40) para a aquosa; para o extrato salino

total foram positivas 92,5% (37/40) das amostras, e para suas frações detergente e aquosa, respectivamente, 92,5% (37/40) e 72,5% (29/40). No Grupo 2, 43,3 % (26/62) das amostras foram positivas para o líquido de vesícula total, 17,7% (11/62) para sua fração detergente e 19,4% (12/62) para a aquosa; enquanto para o extrato salino total foram positivas 25,8% (16/62) das amostras e, respectivamente, 11,7 % (7/62) para sua fração detergente e 37,1% (23/62) para a aquosa. No Grupo 3 nenhuma amostra (0/30) foi positiva para o líquido de vesícula total, 3,33% (1/30) foram positivas para sua fração detergente e 26,6% (8/30) para a aquosa; no extrato salino total a positividade observada foi 3,33% (1/30), e para suas frações detergente e aquosa, respectivamente, 0% (0/30) e 23,3% (7/30).

Amostras de soro de pacientes com outras parasitoses foram testadas para se verificar a ocorrência de reações cruzadas no teste ELISA para NC (Tabela 2), resultados falso-positivos foram observados, principalmente, em pacientes com infecções relacionadas ao parasito *Echinococcus granulosus*.

Tabela 2 - Reações cruzadas na sorologia por ELISA para NC com soros positivos para outras parasitoses.

Parasito	Antigenos					
	Líquido de vesícula			Extrato salino		
	Total	Detergente	Aquosa	Total	Detergente	Aquosa
	n+ (%)	n+ (%)	n+ (%)	n+ (%)	n+ (%)	n+ (%)
Ancilostomídeo (n=6)	3 (50)	0 (0)	1 (33,3)	0 (0)	0 (0)	1 (33,3)
<i>A. lumbricoides</i> (n=6)	1 (16,6)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	3 (50)
<i>E. vermicularis</i> (n=6)	1 (16,6)	0 (0)	0(0)	0 (0)	0 (0)	2 (33,3)
<i>G. lamblia</i> (n=4)	2 (50)	0 (0)	0(0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)
<i>S. stercoralis</i> (n=4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	2 (50)
Taenia sp (n=10)	4 (40)	0 (0)	0 (0)	3 (30)	0 (0)	2 (20)
<i>H. nana</i> (n=4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50)
<i>E. granulosus</i> (n= 10)	10 (100)	10 (100)	9 (90)	10 (100)	7 (70)	10 (100)
<i>T. trichiura</i> (n= 2)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>S. mansoni</i> (n= 10)	5 (50)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

n = Número de amostras testadas.

n+ = Número de amostras positivas.

A Figura 4 mostra os resultados de todas as amostras de soro (Grupos 1, 2 e 3) testadas pelo ELISA e as diferenças estatísticas entre os grupos, para cada extrato antigênico.

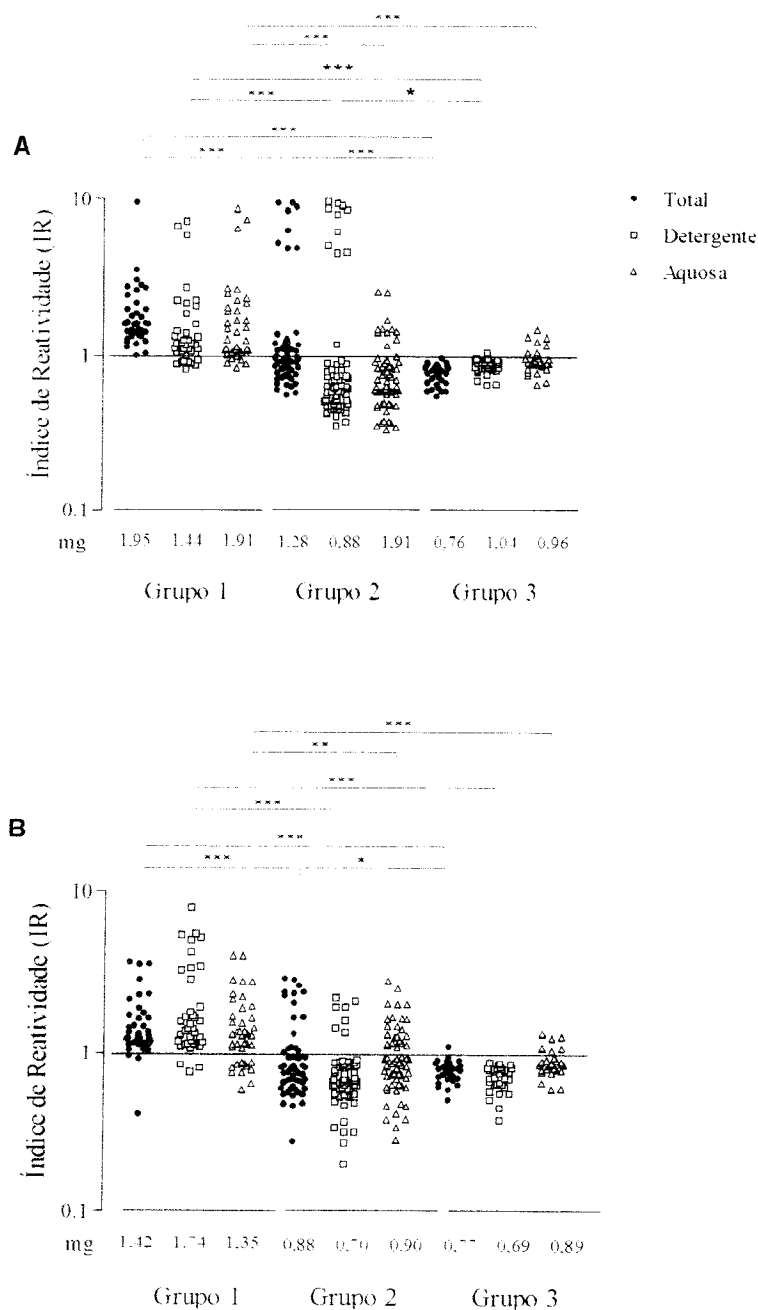


Figura 4. ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro de pacientes com diagnóstico de NC (Grupo 1; n = 40), outras parasitoses (Grupo 2; n= 62) e indivíduos saudáveis (Grupo 3; n = 30) usando o líquido de vesícula e extrato salino sem fracionamento (total), e suas respectivas fases: detergente e aquosa. A barra horizontal indica o *cut off*, mg: média geométrica, A = Líquido de vesícula, B = Extrato salino. Diferenças estatísticas entre os grupos: *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

Foram feitos os cálculos da sensibilidade, especificidade e eficiência do diagnóstico (ED) e Índice Younden (IY), conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade, Eficiência de Diagnóstico (ED) e Índice Younden (IY) do líquido de vesícula e do extrato salino e suas respectivas frações detergente e aquosa .

Antígeno	Sensibilidade	Especificidade	ED	IY
Líquido de vesícula				
Total	100%	78%	83,5%	0,78
Detergente	83,3%	88,5%	86,8%	0,72
Aquosa	88,3%	82,1%	84%	0,71
Extrato salino				
Total	93 %	84,4%	86,6%	0,77
Detergente	93%	92,9%	93%	0,86
Aquosa	78,4%	75,4%	76,3%	0,54

Quanto mais próximo de um for o IY, melhor o antígeno. Com base nos valores da Tabela 3, podemos verificar que a fração detergente do extrato salino foi a mais sensível e específica e o IY confirma estes resultados.

4 - DISCUSSÃO

A severidade dos sintomas e o pleomorfismo de achados clínicos de pacientes com NC, fazem com que novas metodologias para pesquisa de anticorpos circulantes, sejam incessantemente investigadas (RICHARDS, SCHANTZ, 1991). Deste modo a aplicabilidade de técnicas imunológicas utilizando antígenos de metacestódeos de *T. solium* em amostras de soro ou LCR, representam papel fundamental, tanto no diagnóstico sorológico quanto em estudos soroepidemiológicos da cisticercose (COSTA, 1986).

Os procedimentos que utilizam o Triton X-114 na purificação de antígenos são considerados simples, econômicos, altamente eficientes, além de apresentar menor toxicidade em relação às extrações que utilizam solventes orgânicos. Uma vez que procedimentos que utilizam este reagente na purificação de antígenos são relativamente rápidos e não necessitam de equipamentos especializados ou vários ciclos de ultracentrifugação (BRICKER et al., 2001; MONZOORI, BAVILI-TABRIZI, 2002). Tendo em vista estes fatores, foi possível a realização da purificação tanto do extrato salino como do líquido de vesícula pelo Triton X-114.

Glicoproteínas, antígenos de baixo peso molecular (8-50 kDa) e antígenos de excreção e secreção dos metacestódeos de *T. solium*, têm sido utilizados no diagnóstico da cisticercose (FERRER, et al., 2007). A detecção de anticorpos específicos contra a forma metacestódea de *T. solium* em amostras de soro de pacientes com suspeita de NC pelo ELISA é uma ferramenta bastante útil na detecção da doença (WILSON; BRYAN; FRIED, 1991; SIMAC et al., 1995), uma vez que o teste é capaz de diagnosticá-la em sua forma mais leve ou em pacientes com poucas lesões no SNC (LARRALDE et al., 1986; MURALIDHAR et al., 1990).

Variações significantes são observadas nos resultados do ELISA para NC. Estas variações são provavelmente relacionadas à vários fatores, incluindo a heterogeneidade dos pacientes estudados, o perfil imunológico dos pacientes, estágio de desenvolvimento do cisticercose, as propriedades intrínsecas das técnicas, o modo de preparação do antígeno, a qualidade do conjugado e do substrato usado nos ensaios e o método para cálculo do valor do *cut off*, dentre outros fatores (CORREA et al., 1989; NG; KO, 1994; GARCIA et al., 1998).

A sensibilidade do teste para os antígenos totais (LV e S) testados foi acima de 90% , estes dados estão de acordo com os estudos de Tsang; Brand; Boyer (1989); Feldman et al. (1990) e Prestes-Carneiro et al. (2006), onde estes observaram uma alta sensibilidade do teste ELISA em pacientes com NC confirmada ou em suspeita.

Semelhante aos resultados de Costa (1986), o uso de diferentes frações antigênicas de metacestódeos de *T. solium* no teste ELISA resultou em diferenças na sensibilidade e especificidade.

O método de purificação do líquido de vesícula da forma metacestódea de *T. solium* através do TX-114 foi estudado pela primeira vez no diagnóstico da NC, sendo obtidas duas frações antigênicas (detergente e aquosa), dentre as quais, a fração detergente demonstrou ser mais específica que o líquido de vesícula total e sua fração aquosa.

As proteínas de 22 e 24 kDa expressas pelo líquido de vesícula total e a de 24 kDa da sua fração aquosa, estão entre as glicoproteínas de 10-26 kDa, presentes no líquido vesicular da forma metacestódea de *T. solium*, utilizadas com propósito de diagnóstico da cisticercose (SAKO et al, 2006). A proteína de 33 kDa expressa pelo líquido de vesícula total e sua fração aquosa, tem sido utilizada no diagnóstico de teníase mas não da cisticercose (LEVINE et al., 2004).

O método de purificação do extrato salino total da forma metacestódea de *T. solium* através do TX-114 foi estudada pela primeira vez no diagnóstico da NC por Machado (2003), onde a fração detergente mostrou maior especificidade que a aquosa e o extrato salino total, a eficiência do diagnóstico e o Índice Younden reafirmaram a superioridade do teste ELISA utilizando esta fração, o mesmo foi observado neste trabalho, onde a fração detergente do extrato salino (DS) demonstrou ser a mais específica e sensível.

As diferenças entre a positividade para as frações detergente e aquosa tanto do líquido de vesícula quanto do extrato salino podem estar relacionados ao fato observado por Bordier (1981), no qual, após o fracionamento pelo TX-114 as proteínas hidrofílicas são encontradas exclusivamente na fração aquosa, enquanto as proteínas integrais da membrana, de natureza anfifílica, estão presentes na fração detergente e são associadas à porções glicídicas, que funcionam como importantes marcadores celulares.

O fato da fração detergente do extrato salino ter sido mais específica e sensível está relacionado à expressão da banda 50-70 kDa por esta fração. A proteína GP 50, cujo peso molecular é 50 kDa, está associada com o diagnóstico da cisticercose e tem sido utilizada nos últimos 15 anos. A GP 50 é uma glicoproteína integral de membrana com glicosil fosfatidil inositol, cuja atividade antigênica depende da formação correta das pontes dissulfeto (HANCOCK et al., 2004).

Os resultados encontrados para a fração DS, estão de acordo com o estudo de Bueno et al (2005), onde a banda de 50 kDa apresentou sensibilidade e especificidade de 94,7% e

93,8%, respectivamente, no teste ELISA para diagnóstico da cisticercose em amostras de soro.

Utilizando a fração detergente resultados satisfatórios também foram descritos por Chaturvedi; Gupta (2001), onde o desempenho de antígenos integrais de membrana de *Mycobacterium habana* recuperados desta fração durante o tratamento com TX-114 mostraram ser promissores no sorodiagnóstico da tuberculose extrapulmonar com substancial especificidade e sensibilidade.

Resultados falso-negativos ocorridos no Grupo 1 podem ser associados a possíveis calcificações intra-parenquimatosas no SNC, mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, uma vez que interações parasito-hospedeiro são de natureza complexa em função de antígenos parasitários em diferentes estágios evolutivos, variações genéticas individuais de cada paciente, número de cisticercos e suas diferentes localizações. Todas estas variações podem contribuir com a diminuição da sensibilidade dos ensaios para diagnosticar a NC (WILSON, TSANG, 1995; MACHADO et al., 1996).

Além disso, pode-se sugerir que se trata de casos assintomáticos da doença, uma vez que análises de protocolos de necropsias revelaram pacientes com inúmeras calcificações e que, no entanto não apresentavam nenhum sintoma característico para NC (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998; REY, 2001). Estes resultados podem acontecer ainda quando apenas a doença parenquimal é presente, sugerindo tolerância imunológica ao parasito ou uma baixa produção de anticorpos (ZINI; FARREL; WADEE, 1990).

A positividade observada entre algumas amostras de soro de pacientes com outras parasitoses (Grupo 2), possivelmente ocorreu devido a reações cruzadas, fato que ocorre principalmente em áreas endêmicas para cisticercose, conforme demonstrado por Zini; Farrel; Wadee (1990); Garcia et al. (1998); Chung et al. (1999); Garcia et al. (2003); Ishida et al. (2003) e Parija, et al. (2004). Bragazza et al (2002) descreveram 20 % de reações cruzadas em 1863 amostras de soro quando populações de áreas endêmicas foram testadas.

O estudo do grupo com outras parasitoses é importante na análise dos dados porque representa a população em geral, especialmente em nosso país onde as doenças parasitárias são altamente prevalentes, e estas reatividades cruzadas podem ocorrer em testes de triagem como o ELISA, nos quais os resultados requerem maior especificidade, como observado no uso de antígenos purificados.

Neste trabalho a reação cruzada mais freqüente ocorreu em amostras de soro de pacientes com *E. granulosus*, resultados estes também observados por outros autores (ITO; NAKAO; KUTSUMI, 1993; GARCIA et al. 1998). Esta reatividade cruzada está relacionada

ao compartilhamento de componentes antigênicos por espécies filogeneticamente próximas (ISHIDA et al., 2003).

Na resposta imune, para o caso de componentes antigênicos comuns, possivelmente, a conformação protéica seja importante para a imunogenicidade e antigenicidade e é esperado que mais de um epítipo seja reconhecido por cada indivíduo, particularmente em humanos, onde a resposta imune é altamente heterogênea (ESPINDOLA, et al., 2005).

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

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

ALLAN, J.C.; GARCIA DOMINGUEZ, C.; CRAIG, P.S.; ROGAN, M.T.; LOWE, B.S.; FLISSER, A. Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Cambridge, v.85, p.573-576, 1991.

BARBIERI, M.; FERNÁNDEZ, V.; GONZÁLEZ, G.; LUACES, V.M.; NIETO, A. Diagnosis evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hidatidosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.20, n.2, p.51-61, 1998.

BARRY, M.; KALDJIAN, L.C. Neurocysticercosis. **Seminars in Neurology**, United States, v. 13, n. 2, p. 131- 143, 1993.

BASSI, G.E.; ISHIKI, D.K.; FERREIRA, A.W.; CAMARGO, M.E. A reação imunoenzimática para cisticercose no líquido cefalorraquidiano – considerações sobre o limiar de reatividade. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**. Rio de Janeiro, v.27, n.2, p.49-52, 1991.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.256, n.4, p.1604-1607, 1981.

BRAGAZZA, L.M.; VAZ, A.J.; PASSOS, A.D.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; NAKAMURA, P.M.; ESPINDOLA, N.M.; PARDINI, A. X.; BUENO E. C. Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community (Cássia dos Coqueiros, SP) determined by ELISA and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, p.7-12, 2002.

BRICKER, T.M.; PREVOST, M., V. V., LABORDE, S., WOMACK, J., FRANKEL, L.K. Isolation of luminal proteins from spinach thylakoid membranes by Triton X-114 phase partitioning. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1503, n.3, p.350-356, 2001.

BUENO, E.C.; SCHEEL, C.M.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; TSANG, V.C.W.; HANCOCK, K. Application of synthetic 8-kd and recombinant gp50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v.72, n.3, p. 278-283, 2005.

¹ NBR-6023/2002 da ABNT

immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.24, n.6, p.337-341, 1982.

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

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

DeGIORGIO, C.; PIETSCH-ESCUETA, S.; TSANG, V - Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. **Acta Neurologica Scandinavica**, Denmark, v.111, p. 84-88, 2005.

DEL BRUTTO, O.H. Neurocysticercosis. **Seminars in Neurology**, United States, v.25, n.3, p.243- 251, 2005.

DEL BRUTTO, O.H.; SANTIBANEZ, R.; NOBOA, C.A.; AGUIRRE, R.; DIAZ, E.; ALARCON, T.A. Epilepsy due to neurocysticercosis: analyses of 203 patients. **Neurology**, Hagerstown, v. 42, p. 389-392, 1992.

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**, Amsterdam, n.142, n.1-2, p. 1-6, 1996.

DEL BRUTTO, O.H.; SOTELO, J.; ROMAN, G.C. **Neurocysticercosis. A clinical handbook**, 1998.

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.; GARCIA, H.H. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Neurology**, Hagerstown, v.57, n.2, p.177-183, 2001.

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

EDDI, C.; NARI, A.; AMANFU, W. *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 87, p. 145-148, 2003.

ESPINDOLA, N.M.; IHA, A.H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O.M.; MACHADO, L.R.; LIVRAMENTO, J.A.; MAIA, A.A.M.; PERALTA, J.M.; VAZ, A.J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.7, p. 3178-3184, 2005.

FELDMAN, M.; PLANCARTE, A.; SANDOVAL, M.; WILSON, M.; FLISSER, A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 84, p. 559–562, 1990.

FERRER, E.; CORTEZ, M.M.; CABRERA, Z.; ROJAS, G.; D'AVILA, I.; NOYA, B.A.; PEREZ, H.A.; FERNANDEZ, I.; ROMERO, H.U.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GARATE, T. Oncospherical peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 99, p. 568-576, 2005.

FERRER, E.; BONAY, P.; FOSTER-CUEVAS, M.; GONZALEZ, L.M.; DAVILA, I.; CORTEZ, M.M.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GARATE, T. Molecular cloning and characterisation of Ts8B1, Ts8B2 and Ts8B3, three new members of the *Taenia solium* metacestode 8 kDa diagnostic antigen family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v. 152, p. 90-100, 2007.

FLEURY, A.; HERNANDEZ, M.; FRAGOSO, G.; PARKHOUSE, R.M.; HARRISON, L.J.; SCIUTTO, E. Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 97, p. 542-546, 2003.

FLISSER, A. Neurocysticercosis in México. **Parasitology Today**, England, v. 4, p. 131-136, 1988.

FLISSER, A.; RODRIGUEZ-CANUL, R.; WILLINGHAM, A.L. Control of the teniosis/cysticercosis complex: Future developments. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.139, n.4, p. 283-292, 2006.

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

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. Imaging finding in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v.87, n.1, p.71-78, 2003.

GARCIA, H. H.; HARRISON, L. J. S.; PARKHOUSE, R. M. E.; MONTENEGRO, T.; MARTINEZ, S. M.; TSANG, V. C. W.; GILMAN, R. H.; Cysticercosis Working Group in Peru. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 92, p. 411–414, 1998.

GARCIA, H.; DEL BRUTTO O.H. *Taenia solium* cysticercosis. **Infectious Diseases Clinics of North América**, St. Louis, v.14, n.1, p. 97 -119, 2000.

GARCÍA, H.H.; GONZÁLEZ, A.E.; EVANS, C.A.W.; GILMAN, R.H. *Taenia solium* cysticercosis. **The Lancet**, London, v.361, p.547-556, 2003.

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

GILMAN, R.H.; DEL BRUTTO, O.H.; GARCÍA, H.H.; MARTÍNEZ, M. Prevalence of taeniosis among patients with neurocysticercosis is related to severity of infection. **Neurology**, Hagerstown, v.55, n. 7, p. 1062, 2000.

GOODMAN, K.; BALLAGH, S.A.; CARPIO, A. Case control study of seropositivity for cysticercosis in Cuenca, Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v. 60, p. 70-74, 1999.

GROGL, M.; ESTRADA, J.J.; MACDONALD, G. Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. **Journal of Parasitology**, United States, v. 71, p.433-442, 1985.

HANCOCK, K.; KHAN, A.; WILLIAMS, F.B.; YUSHAK, M.L.; PATTABHI, S.; NOH, J.; TSANG, V.C.W. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.6, p.2577-2586, 2003.

HANCOCK, k.; PATTABHI, M.; GREENE M.R.; YUSHAK, M.L.; WILLIAMS, F.; KHAN, A.; PRIEST, F.W.; LEVINE, M.Z.; TSANG V.C.W. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Netherlands, v.133, n.1, p.115-124, 2004.

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

HOBERG, E.P. *Taenia* tapeworms: Their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n.8, p.859-866, 2002.

HOFFMANN, W.A.; PONS, J.A.; JANER, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni, Puerto Rico. **Journal of Public Health Tropical Medicine**. Oxford, v.9, p.283-291, 1934.

HUBERT, K, ADRIANTSIMAHAVANDY, A.; MICHAULT, A.; FORSCH, M.; MUHLSECHLEGEL, F. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens of *Taenia solium* cisticerci. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 6, p. 479-482, 1999.

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

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

ITO, A.; NAKAO, M.; KUTSUMI, H. Serodiagnosis of alveolar hydatid disease by western blotting. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.87, p.170-172, 1993.

KYVSGAARD, N.; JOHANSE, M.V.; CARABIN, H. Simulating transmission and control of *Taenia solium* infections using Reed-Frost stochastic model. **International Journal for Parasitology**, article in press, 2007.

LAEMMLI, V.R. Cleavage of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis. **Parasitology Research**, Berlin, v.84, n.7, p.565-569, 1970.

LARRALDE, C.; LACLETTE, J.P.; OWEN, C.S.; MADRAZO, I.; SANDOVAL, M.; BOJALIL, R.; SCIUTTO, E.; CONTRERAS, L.; ARZATE, J.; DIAZ, M.L. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v. 35, p. 965-973, 1986.

LEE, E.G.; LEE, M.Y.; CHUNGB, J.Y.; JEA, E.Y.; BAEA, Y.A.; NAA, B.K. ;KIMC, T.S.; EOMD, K.S.; CHOA, S.Y.; KONGA, Y. Feasibility of baculovirus-expressed recombinant 10-kDa antigen in the serodiagnosis of *Taenia solium* neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 99, p. 919-926, 2005.

LEVINE MZ, CALDERON JC, WILKINS PP, LANE WS, ASARA JM, HANCOCK K, GONZALEZ AE, GARCIA HH, GILMAN RH, TSANG VC.. Characterization, cloning and expression of two diagnostic antigens for *Taenia solium* tapeworm infection. **Journal of Parasitology**, United States, v. 90, p. 631–638, 2004.

LOWRY, V.H.; ROSEBROUCH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.193, p.265-275, 1951.

MACEDO, H.W.; PERALTA, R.H.S.; CIPRIANO, A.; SARMENTO, M.R.; VAZ, A.J.; PERALTA, J.M. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.38, n.2, p.93-103, 2002.

MACHADO, L.R; LIVRAMENTO, J.A.; SPINA-FRANÇA, A.; NOBREGA, J.P.S. **Neuroinfecção 96**. SP:HC/FMUSP- Clínica neurológica, p. 245-252, 1996.

MACHADO, G.A. **Avaliação de diferentes frações antigênicas da forma metacestódea de *Taenia solium*, obtidas por diferentes graus de hidrofobicidade, no diagnóstico da neurocisticercose humana**. 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) – Centro de Ciências biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

MAHAJAN, D.; KHURANA, N.; SETIA, N. Coexistence of salivary gland cysticercosis with squamous cell carcinoma of mandible. **Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, United States, v. 103, n. 3, p.47-50, 2007.

MEDINA, M. T.; DURON, R. M.; MARTINEZ, L.; OSORIO, J. R.; ESTRADA, A. L.; ZUNIGA, C.; CARTAGENA, D.; COLLINS, J. S.; HOLDEN, K. R. Prevalence, incidence and etiology of epilepsies in rural Honduras: the Salama Study. **Epilepsia**, Auburn, v. 46, n. 1, p. 124-131, 2005.

MONTEIRO, L. L.; PINTO, P. S. A.; DIAS F. S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 141, p. 260–263, 2006.

MONZOORI, J.L.; BAVILI-TABRIZI, A. Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.470, n.2, p.215-221, 2002.

MURALIDHAR, K.; JAGANNATH, C.; GOKUL, B.N.; CHANDRAMUKHI, A.; SEHGAL, S. Antigenic analysis of *Cysticercus cellulosae* by crossed immuno-electrophoresis and its role in the immune diagnosis of neurocysticercosis. **The Indian Journal of Medical Research**. India v. 91, p. 39– 43, 1990.

NASCIMENTO, E. Teníase e Cisticercose. In. NEVES, D.P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, Cap. 25, p. 207-215, 2003.

NG. T. F.; KO, R. C. Serodiagnosis of cysticercosis: specificity of different antigens and enzyme-linked immunosorbent assays. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London**, v. 88, p. 421–422, 1994.

NGUEKAM, J. P.; ZOLI, A. P.; ZOGO, P. O.; KAMGA, A. C. T.; SPEYBROECK, N.; DORNY, P.; BRANDT, J.; LOSSON, B.; GEERTS, S. A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, V. 8, n. 2. p.144-149, 2003.

NIIZUMA, K.; FUJIMURA, M.; KUMABE, T.; TOMINAGA, T. Malignant transformation of high-grade astrocytoma associated with neurocysticercosis in a patient with Turcot syndrome. **Journal of Clinical Neuroscience**, Scotland, v.14, p.53-55, 2007.

PARDINI, A.X.; PERALTA, R.H.; VAZ, A.J.; MACHADO, L.R.; PERALTA, J.M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.9, n.1, p.190-193, 2002.

PARIJA, M.; BISWAS, R.; HARISH, B.N.; PARIJA, S.C. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. **Acta Tropica**, Amsterdam v. 92, n. 3. p.253-260, 2004.

PATEL, R.; JHA, S.; YADAV, R.K. Pleomorphism of the clinical manifestations of neurocysticercosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.100, n.2, p. 134-141, 2006.

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

PAWLOWSKI, Z.S., ALLAN, J.C., MEINARDI, H. Chapter 6. Control Measures for taeniosis and cysticercosis. In: Murrell, K.D. (Ed.), WHO/FAO/OIE **Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis//cysticercosis**. OIE, Paris, p. 73–92. 2005b.

PÊSSOA, S.B.; MARTINS, S.V. **Parasitologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.448-464, 1982.

PFUETZENREITER, M. R.; ÁVILA-PIRES, F. D. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 541-548, 2000.

PINTO, P. S. A.; ALMEIDA, L. P.; GERMANO, P. M. L.; VAZ, A. J.; NAKAMURA, M. Cysticercosis occurrence and sanitary risks in groups of inspected and non-inspected swine in Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, Santiago, v. 57, n. 3-4, p. 129-133, 2002.

PRESTES-CARNEIRO, L.E.; FREITAS, S.B.Z.; ZAGO, S.C.S.; MIGUEL, N.A.; PRIMO, O.B.; IHA, A.H.; ESPÍNDOLA, N.M.; VAZ, A.J. Taeniosis-cysticercosis complex in individuals of a peasants' settlement (Teodoro Sampaio, Pontal of Paranapanema, SP, Brazil) **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, p. 15-20, 2006

RESTREBO, B.I.; LLAGUNO, P.; SANDOVAL, M.A.; ENCISO, J.A.; TEALE, J.M. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1- like instead of Th2. **Journal of Neuroimmunology**, Netherlands, v. 89, p. 64- 72, 1998.

REY, L. Tênia e teníases. **In: Parasitologia: Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. cap. 38, p.496-509, 2001.

RICHARDS, F.; SCHANTZ, P.M. Laboratory diagnosis of cysticercosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, St. Louis, v.11, n.4, p. 1011-1028, 1991.

SCHANTZ, P.M.; WILKINS, P.P.; TSANG, V.C.W. Immigrants, imaging, and immunoblot the emergence of neurocysticercosis as a significant public health problem. In: SCHELD, W.M.; CRAIG, W.A.; HUGHES, J.M. eds. **Emerging infections**. Washington DC., p. 213-242, 1998.

SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; YAMASAKI, H.; ITO, A. Recombinant antigens for serodiagnosis of cisticercosis and echinococcosis. **Parasitology Internacional**, v.55, p. 569-573, 2006.

SASAKI, M.G.M.; BRIOSCHI, M.L. Teníase. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu. v.2, p.1439-1441, 1997.

SATO, M.O.; YAMASAKI, H.; SAKO, Y.; NAKAO, M.; NAKAYA, K.; PLACARTE, A.; KASSUKU, A.A.; DORNY, P.; GEERTS, S.; BENITEZ-ORTIZ, W.; HASHIGUCHI, Y.; ITO, A. Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v.111, n.4, p.309-322, 2003.

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

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

SILVEIRA-LACERDA, E.P.; MACHADO, E.R.; ARANTES, S.C.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Anti-*Taenia solium* metacestodes antibodies in serum from blood donors from four cities of Triângulo Mineiro area, Minas Gerais, Brazil, 1995. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 229-231, 2002.

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

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

TSANG, V.C.; BRAND, J.A.; BOYER, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 159, p. 50-59, 1989.

VAZ, A.J. Diagnóstico imunológico das parasitoses. In: DE CARLI, G.A. (Ed). **Parasitologia Clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório das parasitoses humanas**. São Paulo: Atheneu, Cap. 29, p.505-539, 2001.

VELASCO, T.R.; ZANELLO, P.A.; DALMAGRO, C.L.; ARAUJO, D.Jr.; SANTOS, A.C.; BIANCHIN, M.M.; ALEXANDRE, V.Jr.; WALZ, R.; ASSIRATI, J.A.; CARLOTTI, C.G.Jr.; TAKAYANAGUI, O.M.; SAKAMOTO, A.C.; LEITE, J.P. Calcified cysticercotic lesions and intractable epilepsy: a cross sectional study of 512 patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, England, v. 77, n.4, p. 485-488, 2006.

ZINI, D.; FARREL, V.J.R.; WADEE, A.A The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, England, v. 53, p. 656-661, 1990.

WHITE , A.C.Jr. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, p.101–115, 1997a.

WHITE, A.C.Jr. State-of-art: neurocysticercosis: a commom cause ogf neurologic disease worldwide. **Clinical Infectous Diseases**, Chicago, v. 24, p. 101-113, 1997b.

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

WILKINS. P.P.; WILSON, M. ALLAN, J.C.; TSANG, V.C. *Taenia solium* cysticercosis: immunodiagnosis of neurocysticercosis an teniasis. In: SINGH, G.; PRAKHABAR, S. eds. **Taenia solium cisticercosis**. Wallinford, UK, p. 619-646, 2002.

WILLINGHAM, A.L.; ENGELS, D. Control of *Taenia solium* Cysticercosis/Teniosis. **Advances in Parasitology**, England,v. 61 C, p. 509-566, 2006.

WILSON, M.; BRYAN, R. T.; FRIED, J. A.; WARE, D. A.; SCHANTZ, P. M.; PILCHER, J. B.; TSANG, V. C. W. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 64, p. 1007–1009, 1991.

WOODHOUSE, E.; FLISSER, A.; LARRALDE, C. Soroepidemiology of human cysticercosis in México. In FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETE, J.P.; LARRALDE, C.; RIDAURA, C.; BELTRÁN, F. **Cysticercosis present state of knowledge and perspective**, New York, Academic Press, p.11-24, 1982.

YANCEY, L.S.; DIAZ-MARCHAN, P.J.; WHITE, A.C. Cysticercosis: Recent Advances in Diagnosis and Management of Neurocysticercosis. **Current Infectious Disease Reports**, Houston, v.7, p.7-39, 2005.

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