

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

GABRIELA BORGES DA SILVA

**Imunoglobulina Y anti-metacésteo de *Taenia crassiceps*: ferramenta
promissora no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana**

Uberlândia
Fevereiro – 2020

GABRIELA BORGES DA SILVA

Imunoglobulina Y anti-metacestódeo de *Taenia crassiceps*: ferramenta promissora no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana

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

Orientadora: Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz

Uberlândia
Fevereiro – 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586
2020 Silva, Gabriela Borges da, 1992-
Imunoglobulina Y anti-metacestódeo de *Taenia crassiceps*:
ferramenta promissora no imunodiagnóstico da neurocisticercose
humana [recurso eletrônico] / Gabriela Borges da Silva. - 2020.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.59>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Cruz, Julia Maria Costa, 1956-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 127 do PPIPA				
Data:	quatorze de fevereiro de dois mil e vinte	Hora de início:	13h30min	Hora de encerramento:	18h 40min
Matrícula do Discente:	11613IPA006				
Nome do Discente:	Gabriela Borges da Silva				
Título do Trabalho:	Imunoglobulina Y anti-metacésteo de Taenia crassiceps: ferramenta promissora no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Métodos diagnósticos em doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Diagnóstico laboratorial da cisticercose humana e veterinária				

Reuniu-se no anfiteatro do bloco 4K Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, presencialmente, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Prof.(a) Dra. Heliana Batista de Oliveira - UFG/Catalão, Prof.(a) Dr.(a): Lucas Silva de Faria -UNIFUCAMP, Dr.(a): Juliana Silva Miranda - ICBIM/UFU, Prof.(a) Dr.(a): Vanessa da Silva Ribeiro -ICBIM/UFU - Prof.(a) Dr.(a): Julia Maria Costa Cruz-ICBIM/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Sra. Julia Maria Costa Cruz apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Julia Maria Costa Cruz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 18:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Silva de Faria, Usuário Externo**, em 14/02/2020, às 18:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa da Silva Ribeiro, Biólogo(a)**, em 14/02/2020, às 18:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Silva Miranda, Técnico(a) de Laboratório**, em 14/02/2020, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **HELIANA BATISTA DE OLIVEIRA, Usuário Externo**, em 14/02/2020, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1820751** e o código CRC **014E0901**.

Dedicatória

À Deus, pelo dom da vida e por me fortalecer em todos os momentos.

À minha mãe, Sueli, por todo amor, incentivo e paciência.

“Cordel das Mães”

“Vixe...

*O cabra pode escolher muita coisa nessa vida... Ser artilheiro ou goleiro,
pedalar ou correr,*

Inté o sabor das coisas a gente pode escolher!

*Mas a coisa mais joiada, mais preciosa, mais arretada da vida da gente, Simplesmente não se
escolhe...*

A MÃE!

*Ela que é um pedacim de Deus no mêi do mundo, Um tantim assim de bravura,
e um tantão assim de ternura.*

*Mãe é doce feito mel de rapadura, macia feito algodão,
cheirosa feito milho na fogueira numa noite de São João.*

Mãe é pura perfeição, não tem pra que escolher.

E mesmo assim,

*se eu tivesse a graça desse poder, de todas as mães do mundo,
teria escolhido você!”*

Bráulio Bessa

À minha família, meu grande tesouro, por todo apoio e amor.

A vocês, minha eterna gratidão!

Agradecimentos

À Deus, por seu amor infinito, por estar ao meu lado em todos os momentos e nunca me abandonar. Por todas as graças alcançadas e por todos os obstáculos superados! Por ser luz em meio a escuridão!

À minha mãe, Sueli de F. P. B. Silva, por todo seu amor e paciência. Por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando e me ajudando a superar os obstáculos. Por ser calma quando a tempestade chega. Por acreditar sempre no meu potencial! Agradeço por ser mais que minha mãe, por ser minha melhor amiga! Você é e sempre será meu melhor exemplo! Por tudo o que você fez e ainda faz por mim, sem você esse sonho não se tornaria realidade! Te amo muito!

Ao meu pai, Manoel Luís da Silva, por todo amor, carinho e valores! Agradeço à Deus por ter me proporcionado, mesmo que por pouco tempo, uma convivência tão especial com você! A saudade é diária, mas as boas lembranças confortam o coração! Te amo e amarei para sempre!

À minha família, em especial às minhas tias Joseli A. Pereira, Joana A. P. B. da Silva, Maria A. S. Borges, e aos meus tios Marcos D. P. Borges, Marco A. Pereira, Melquesedec da Silva, por todo apoio, amor e carinho! Amo vocês!

À minha tia Maria de Lourdes Silva (em memória), por todo incentivo e amor! Agradeço por tudo o que fez por mim e por ter feito parte da minha vida de forma tão especial! Você estará para sempre em meu coração! Te amo!

Aos meus primos, Taís M. Pereira, Tatiane C. Pereira e Fúlvio B. da Silva por todos os abraços que confortam, por todo carinho e amor! Agradeço por serem tão presentes em minha vida! Vocês são muito especiais, amo vocês!

Aos meus avós maternos, Maria L. B. Borges (em memória) e José P. Borges (em memória), por toda contribuição na minha educação, por todo amor e carinho! Vocês fazem parte das minhas melhores lembranças! Sempre amarei vocês!

Ao meu namorado, Thiago B. Machado, por todo amor, companheirismo e paciência. Por caminhar ao meu lado e nunca soltar a minha mão, mesmo nos momentos mais conturbados. Por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma e sempre dizer que tudo dará certo! Por cada abraço nos momentos de angústia! Te amo, e agradeço à Deus por ter encontrado você!

À Jaira B. Machado, minha sogra querida que é como se fosse uma mãe para mim! Agradeço por sua generosidade, pelos abraços que acalentam, pela sua alegria que contagia a todos. Ter você em minha vida é um presente! Te amo!

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz, que continuou acreditando no meu potencial e me permitiu crescer ainda mais como pessoa e profissional durante esses quatro anos de doutorado. Por ser um exemplo de profissional ética! Agradeço por todo conhecimento compartilhado, pela confiança, paciência e por todos esses anos de convivência e amizade! Que Deus continue iluminando-a nesse novo ciclo!

Ao Prof. Dr. Álvaro Ferreira-Júnior pela parceria e todo auxílio metodológico. Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, por disponibilizar o Laboratório de Nanotecnologia, permitindo a execução de parte importante deste trabalho.

À Dra. Juliana Silva Miranda, Dra. Priscila Silva Franco e aos professores Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, Dr. Henrique Tomaz Gonzaga, Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, Dra. Heliana B. de Oliveira, Dr. Lucas Silva de Faria e Dr. Pedro T. Hamamoto Filho, pela participação e sugestões na banca de qualificação e defesa.

Ao Dr. Lucas Silva de Faria, pela ideia do projeto e toda ajuda referente ao mesmo. Agradeço por todos os ensinamentos e amizade.

À Dra. Daniela da Silva Nunes, por todo ensinamento ao longo dos anos e por sempre me incentivar. Agradeço pela confiança, paciência e amizade. Te amo!

À Msc. Camila A. Lopes, por todo auxílio profissional e por ser essa amiga tão querida! Por se fazer presente mesmo quando longe, e, assim, estar presente em todos os momentos! Você é um exemplo de profissional e pessoa! Agradeço por poder contar e aprender com você, e por ter você na minha vida! Te amo muito e sou muito grata por tudo!

Aos meus amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses: Ana Paula Mendes Muniz, Bruna Patrícia Couto, Daniela da Silva Nunes, Edson Fernando Goulart de Carvalho, Guilherme C. M. Paiva, Henrique Tomaz Gonzaga, Jéssica Rodrigues, José Eduardo Neto de Sousa, Lucas Silva de Faria e Luisa Queiroz Corrêa por todo conhecimento compartilhado e auxílio. O verdadeiro significado do trabalho em equipe aprendi com vocês! Por todos os momentos felizes compartilhados e por me ajudarem a superar os difíceis e não me deixarem desistir! Conviver com vocês foi uma grande alegria! Amo vocês!

À Prof. Dra. Vanessa da Silva Ribeiro, pela sua amizade e todo apoio para a finalização deste trabalho. Por me amparar num momento tão difícil e estar sempre disposta a ajudar. Ter você como técnica do laboratório foi um grande presente. Agradeço pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos, por me fazer pensar além! Você é uma grande profissional, obrigada por tudo!

À Dra. Juliana Silva Miranda, pela paciência e incentivo nos momentos difíceis. Pelos ensinamentos, generosidade e disponibilidade!

À Dra. Emília R. Vaz e ao Dr. Tafarel A. de Souza, pela paciência, por todo auxílio metodológico e amizade. Agradeço por tudo o que fizeram por mim!

Às amigas Ariele Verônica da Silva, Karol Maira Dias, Keliane Dalpian e Laís Gabriel, agradeço pelo apoio nos momentos difíceis e pelos momentos felizes compartilhados.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia, em especial à Maria do Rosário de Fátima Gonçalves Pires, pela paciência e conhecimento compartilhado. Por ser essa pessoa tão amável e iluminada!

Aos colegas de pós-graduação, pelos momentos juntos vividos, em especial à minha amiga Iasmin A. C. Araújo, pelos momentos de alegria compartilhados, pelas palavras de apoio nos momentos difíceis e por sua disponibilidade em ajudar. Agradeço pela sua amizade!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos conhecimentos compartilhados, colaborando em minha formação.

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

A todos que, de alguma forma, fizeram parte desse ciclo e contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal, o meu muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”.

Augusto Cury

RESUMO

A neurocisticercose (NCC) é uma doença tropical negligenciada e seu diagnóstico continua um desafio em vista das manifestações inespecíficas. Técnicas de neuroimagem são utilizadas no diagnóstico da NCC, no entanto, devido ao alto custo desses métodos e as vantagens apresentadas no uso de testes imunológicos, como facilidade de execução e resultados satisfatórios, os imunoenaios são comumente utilizados para detectar anticorpos contra antígenos de *Taenia* sp. O objetivo deste estudo foi produzir, fracionar, isolar e caracterizar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas inoculadas com extrato salino total de formas metacestódeas de *T. crassiceps*. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) do tipo indireto, ELISA de avides, *immunoblotting* e imunofluorescência indireta foram realizados para caracterização dos anticorpos IgY. O índice ELISA aumentou consideravelmente a partir da semana quatro, com crescimento de produção, e observou-se alto índice de avides (IA); IgY reconheceu bandas polipeptídicas imunodominantes com 24-215 kDa e ensaios de imunofluorescência confirmaram o potencial de anticorpos IgY anti-*T. crassiceps* para reconhecer tecidos de metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium*. A performance diagnóstica foi verificada por ELISA para a detecção de imunocomplexos, testando 90 amostras de soro divididas em três grupos: grupo 1 (n = 30), indivíduos com diagnóstico definitivo de NCC; grupo 2 (n = 30), indivíduos com outras infecções parasitárias; e grupo 3 (n = 30) indivíduos aparentemente saudáveis. Valores de sensibilidade (Se), especificidade (Sp), razão de probabilidade positiva e negativa (RP+/RP-) e área sob a curva (ASC) foram calculados. Os parâmetros diagnósticos apresentaram os seguintes resultados: Se 83,3%; Es 96,7%; RP + = 25,0; RP- = 0,17 e ASC 0,966. Para seleção de peptídeos com afinidade de ligação aos anticorpos IgY anti-Tc e IgY anti-dTc por *phage-display*, uma biblioteca de peptídeos randômicos expressados em bacteriófagos filamentosos foi utilizada. Foram identificados três clones de fagos principais, sendo C11 considerado com os melhores valores diagnósticos para detecção de IgG no imunodiagnóstico da NCC humana (C11 - Se 80%, Es 83,3%). Os resultados deste estudo demonstram que anticorpos IgY anti-*T. crassiceps* apresentam potencial aplicabilidade e podem ser utilizados como uma ferramenta promissora no imunodiagnóstico da NCC humana.

Palavras-chave: Neurocisticercose; *Taenia crassiceps*; IgY de gema de ovo; imunodiagnóstico, *phage-display*.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is a neglected tropical disease and its diagnosis remains a challenge due to nonspecific manifestations. Neuroimaging techniques are used in NCC diagnosis, however, due to the high cost of these methods and the advantages presented in the use of immunological tests, such as easiness to perform and satisfactory results, immunoassays are commonly used to detect antibodies against *Taenia* sp. antigens. The aim of this study was to produce, fractionate, isolate and characterize IgY antibodies from egg yolk of hens immunized with *T. crassiceps* metacestodes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indirect type, avidity ELISA, immunoblotting and indirect immunofluorescence tests were performed for characterization of IgY antibodies. ELISA index increased considerably from the week four, with growth of the production, and high avidity index (AI) were observed; IgY recognized immunodominant polypeptides bands with 24-215 kDa and immunofluorescence assays confirmed the potential of anti-*T. crassiceps* IgY antibodies to recognize *T. crassiceps* and *T. solium* metacestodes tissue. Diagnostic performance was verified by ELISA for immune complexes detection testing 90 serum samples divided into three groups: group 1 (n=30), individuals with NCC definitive diagnosis; group 2 (n = 30), individuals with other parasitic infections; and group 3 (n = 30) apparently healthy individuals. Values of sensitivity (Se), specificity (Sp), positive and negative likelihood ratios (LR+/LR-) and area under the curve (AUC) were calculated. Diagnostic parameters presented the following results: Se 83.3%; Sp 96.7%; LR+ = 25.0; LR- = 0.17 and AUC 0.966. For selection of peptides with binding affinity to anti-Tc and anti-dTc IgY antibodies by phage-display, a library of random peptides expressed in filamentous bacteriophages was used. Three main phage clones were identified, being C11 considered with the best diagnostic values for IgG detection in immunodiagnostic (C11 – Se 80%, Es 83.3%). Results of this study demonstrate that anti-*T. crassiceps* IgY antibodies present potential applicability and can be used as a promising tool in human NCC immunodiagnosis.

Keywords: Neurocysticercosis; *Taenia crassiceps*; egg yolk IgY; immunodiagnosis, *phage-display*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Estrutura do fago filamentosso utilizado na técnica de *phage display*. 35
- Figura 2.** Estrutura do anticorpo IgY frente ao anticorpo IgG. 37
- Figura 3.** Imunizações, coleta de ovos e sangue das galinhas. ACF: adjuvante completo de Freund; AIF: adjuvante incompleto de Freund. As galinhas foram imunizadas com 100 µg extrato salino total de *T. crassiceps* (GI, n = 2) e com PBS (GII, n = 2) nas semanas 1, 3, 5 e 7. As imunizações foram realizadas via intramuscular, em diferentes pontos do músculo peitoral, nas quais um volume total de 500 µL (250 µL de Tc em PBS + 250 µL de adjuvante completo/incompleto de Freund) foi utilizado. Os ovos foram coletados semanalmente durante a experimentação, com início uma semana antes da primeira imunização (semana 0, pré-imune). Amostras de sangue foram coletadas semanalmente para acompanhamento da soroconversão. 43
- Figura 4.** Representação esquemática dos processos de seleção negativa e positiva por *biopanning*. 52
- Figura 5.** (A) Formas metacestódeas de *Taenia crassiceps* utilizadas na preparação antigênica; (B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato salino total de *T. crassiceps* utilizado nas imunizações das galinhas. Padrão de peso molecular (P.M.). kDa: kiloDalton. 58
- Figura 6.** Etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY provenientes das gemas dos ovos das galinhas. 59
- Figura 7.** Cromatograma obtido do isolamento das imunoglobulinas Y anti-Tc (6^a e 8^a semanas). O pico número 1 corresponde a eluição dos anticorpos aderidos na coluna cromatográfica (tubos 35-50) e o segundo pico (2) corresponde à ovoalbumina, que foi descartada. 61

Figura 8. Ensaio *dot blot* para confirmação da presença de IgY anti-Tc após processo de 61 isolamento. (A) IgY anti-Tc isolada; (B) Controle negativo: Soroalbumina bovina (BSA 1%).

Figura 9. Eletroforese em SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, das etapas do 62 processo de fracionamento e isolamento das IgY anti-Tc. G – Solução de gema; S1 – sobrenadante proteico; P1 – precipitado lipídico; S2 – sobrenadante descartado pós-precipitação proteica; P2 – precipitado rico em IgY pós-precipitação; *p* – *pool* de anticorpos isolados da sexta e oitava semana. PM: Padrão de peso molecular; kDa: kiloDalton; coloração por *Coomassie Brilliant Blue*.

Figura 10. (A) Cinética de produção dos anticorpos IgY anti-Tc obtidos das gemas dos ovos 63 (•) e dos soros (♦) das galinhas. A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1); semana 0 = Pré-imunização; * = imunizações. Ensaio de avidéz (B) dos anticorpos IgY anti-Tc fracionados obtidos das gemas dos ovos, tratados com ureia 6 M. Índice de avidéz foi considerado alto quando AI > 60%; * = imunizações.

Figura 11. Aplicação de anticorpos IgYi anti-Tc na detecção de polipeptídeos antigênicos 64 do extrato total de *T. crassiceps* por *Immunoblotting*. (A) *pool* de IgYi; (B) semana pré-imune. P.M.: Padrão de peso molecular; kDa: kiloDalton.

Figura 12. Imunofluorescência indireta em cortes histológicos de metacestódeos de *T.* 65 *crassiceps* e *T. solium* utilizando IgYi anti-Tc. (A): anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC); (B): Contracoloração com azul de Evans; (C): das colunas A com a B.

Figura 13. (A) Detecção de imunocomplexos por ELISA em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose confirmada (GI; n = 30); pacientes com outras infecções parasitárias (GII; n = 30) e indivíduos saudáveis (GIII; n = 30). A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1); as barras horizontais indicam a média e as verticais os desvios padrões; *: one-way ANOVA, com pós teste de Tukey (p < 0,0001). (B) *Receiver operating characteristic curves* (curva ROC) indicando no ponto de *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (ASC). Razões de probabilidades (RP+ e RP) foram calculados. 67

Figura 14. Titulação dos clones de fagos obtida pela contagem de colônias azuis para a obtenção dos títulos de entrada e saída dos ciclos de seleção. O número de colônias azuis foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente. Os resultados foram expressos em UFC (unidade formadora de colônias). 68

Figura 15. Phage-ELISA para análise da reatividade dos clones de fagos obtidos após os ciclos de *biopanning*. (A) Clones de fagos obtidos da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); (B) Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior reatividade. Colunas marsala e laranja representam a reatividade dos clones à IgY anti-Tc e anti-dTc, respectivamente (A, B). Colunas cinza representam reatividade dos clones à IgY controle (A, B). DO – Densidade óptica a 492 nm. 70

Figura 16. Phage-ELISA para *screening* dos clones de fagos purificados. (A) Clones de fagos selecionados da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); (B) Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior especificidade aos anticorpos IgY anti-Tc e anti-dTc. Colunas marsala e laranja representam a reatividade dos clones à IgY anti-Tc e anti-dTc, respectivamente (A, B). Colunas cinza representam reatividade dos clones à IgY controle (A, B). DO – Densidade óptica a 492 nm. 71

Figura 17. Phage-ELISA para *screening* dos clones de fagos selecionados para o diagnóstico sorológico da NCC humana. Foram utilizados *pool* de soros aleatórios de pacientes com NCC confirmada, pacientes saudáveis e pacientes com outras infecções parasitárias. Um clone de fago selvagem (irrelevante) foi utilizado como controle. **(A)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); **(B)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior especificidade aos anticorpos IgY anti-Tc e anti-dTc. DO – Densidade óptica a 492 nm. 72

Figura 18. Análise das sequências de aminoácidos obtidas em múltiplos alinhamentos para a identificação de regiões conservadas ou motivos comuns entre os peptídeos selecionados pelo programa Clustal W 2.1. **A:** clone C11 (estratégia 1 - IgY anti-Tc), **B:** clone C7 (estratégia 2 - IgY anti-dTc) e **C:** clone E12 (estratégia 2 - IgY anti-dTc). 76

Figura 19. Detecção de IgG anti-*Taenia* sp. por ELISA utilizando clones de fagos selecionados da estratégia 1 (**A, C11**) e da estratégia 2 (**B, C7; C, E12**). Amostras de soro de pacientes com NCC confirmada (GI; n = 30); pacientes com outras infecções parasitárias (GII; n = 30) e indivíduos saudáveis (GIII; n = 30) foram testadas. A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1). As barras horizontais indicam a média e as verticais os desvios padrões. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração dos anticorpos IgY fracionados obtidos do *pool* semanal das gemas dos ovos. 60

Tabela 2. Títulos obtidos nos ciclos de seleção das estratégias 1 (IgY anti-Tc) e 2 (IgY anti-dTc) por *biopanning*. UFC: unidade formadora de colônias. 69

Tabela 3. Similaridade das sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes das moléculas de IgY com proteínas de *T. crassiceps*. 73

Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes das moléculas de IgY com proteínas de *T. solium*. 74

Tabela 5. Reatividade das amostras de pacientes com outras infecções parasitárias quando utilizado os clones de fagos da estratégia 1 (C11) e da estratégia 2 (C7, E12). 80

Tabela 6. Parâmetros diagnósticos dos clones de fagos selecionados nas duas estratégias analisados por ELISA. 81

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

% - Por cento/porcentagem

μL – Microlitro

μm – Micrômetro

M – Molar

mA – Miliamper

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

pmol – Picomol

aa – Aminoácidos

Abs – Absorbância

Acc – Acurácia

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immunodeficiency syndrome*)

APS – *Ammonium persulfate*/Persulfato de amônio

ASC – Área sob a curva

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic local alignment search tool* (Ferramenta de busca de alinhamento local básico)

BLASTp – *Protein blast* (Ferramenta de busca de alinhamento local básico de proteína)

BSA – *Bovine serum albumin*/Soroalbumina bovina

C1q – Subunidades do primeiro componente do complemento C1

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CEUA – Comissão de Ética na Utilização de Animais

CH1 – Domínio constante de cadeia pesada da imunoglobulina 1

CH2 – Domínio constante de cadeia pesada da imunoglobulina 2

CH3 – Domínio constante de cadeia pesada da imunoglobulina 3

CISS – *3D constructive interferences steady state* (interferências construtivas 3D de estado estacionário)

Cut-off – Limiar de reatividade, ponto absoluto/ótimo de corte

DAB – 3,3' – diaminobenzidino tetrahidrocloro

DALYs – *Disability-adjusted life years*/Anos de vida ajustados por incapacidade

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade óptica

dTc – Fração detergente de *Taenia crassiceps*

EDTA – Etileno diamino tetra acetato

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático ligado a enzima)

Eno A – Enolase A

Eno B – Enolase B

Eno C – Enolase C

Eno 4 – Enolase 4

ER2738 – *Escherichia coli* cepa ER2738

Es – Especificidade

EUA – Estados Unidos da América

F – Teste paramétrico *one-way* ANOVA

Fc – Fragmento ligante de componentes do sistema imunológico

Fd – Bacteriófago da linhagem Fd

FIESTA – *Fast imaging employing steady-state acquisition* (Imagem rápida empregando aquisição em estado estacionário)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

Fp – Fêmeas partenogenéticas

g - Gravidade

G – Gema

h – Hora

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico

HCl - Ácido clorídrico

HPJ – Método de Hoffmann, Pons e Janer

IA – Índice de Aidez

IC – Intervalo de confiança

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas

IE – Índice ELISA

IgA – Imunoglobulina A

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IgG 1 – Subclasse 1 de imunoglobulina G
IgG 2 – Subclasse 2 de imunoglobulina G
IgG 3 – Subclasse 3 de imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IgY – Imunoglobulina Y
IgYc – Imunoglobulina Y controle
IgYf – Imunoglobulina Y fracionada
IgYi – Imunoglobulina Y isolada
Igs – Imunoglobulinas
IL – Interleucina
iL3 – Larvas filarioides
INF- γ – Interferon γ
IPTG – Isopropil- β -d-tiogalactopiranosídeo
kDa – kiloDalton
LB – Meio de cultura Luria-Bertani
LCR – Líquido cefalorraquidiano
LR – *Likelihood ratio* (razão de verossimilhança)
m – Média
M13 – Bacteriófago da linhagem M13
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico
NaCl – Cloreto de sódio
NaI – Iodeto de sódio
NCC – Neurocisticercose
OPD – Ortofenilenodiamina
ORF – Cepa de *Taenia crassiceps*
P – Nível de significância
P1 – Precipitado 1
P2 – Precipitado 2
pIII – Proteína três do capsídeo do fago
pVI – Proteína seis do capsídeo do fago
pVII – Proteína sete do capsídeo do fago
pVIII – Proteína oito do capsídeo do fago
pIX – Proteína nove do capsídeo do fago

PBS – *Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada com fosfato)

PBS-T – *Phosphate buffered saline – Tween* (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20)

PBS-TM – *Phosphate buffered saline – Tween – Milk* (Solução salina tamponada com fosfato adicionada de Tween 20 e leite desnatado)

PEG – Polietileno glicol

pH – Potencial hidrogeniônico

Ph.D.- C7C Biblioteca comercial de *phage display* de 7 aminoácidos de conformação rígida

REBIR – Rede de biotérios de roedores

RM – Ressonância magnética

ROC – *Receiver operating characteristic* (Curvas de características de operação do receptor)

RP+ – razão de probabilidade positiva

RP- – razão de probabilidade negativa

rpm – Rotação por minuto

S1 – Sobrenadante 1

S2 – Sobrenadante 2

SDS – *Sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

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

Se - Sensibilidade

SNC – Sistema nervoso central

ssDNA – *Single-stranded DNA/DNA* de fita simples

T4 – Bacteriófago da linhagem T4

T7 – Bacteriófago da linhagem T7

TA – Temperatura ambiente

TBS – Tampão salina Tris

TBS –T – Tampão salino Tris adicionada de Tween 20

TBS –TM – Tampão salino Tris adicionada de Tween 20 e leite desnatado

Tc – extrato salino total de *Taenia crassiceps*

TC – Tomografia computadorizada

TEMED – tetrametiletilenediamino

TG-ROC – *Two-graph receiver operating characteristic* (Curvas de características de operação do receptor de dois gráficos)

TGF- β – *Transforming growth factor β* / fator de crescimento transformador- β

Th1 – Linfócito T *helper* 1

Th2 – Linfócito T *helper* 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Células T regulatórias

Tris - Hidroximetil

Tris-HCl – Solução de Tris adicionada de HCl

Tween-20 – Polioxietilensorbitano-monolaurato

U – ureia

ufc – Unidade formadora de colônias

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

X-gal - 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Morfobiologia e ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	25
1.2 Epidemiologia da neurocisticercose humana	26
1.3 Resposta imunológica do hospedeiro	28
1.4 Aspectos clínicos da neurocisticercose humana.....	29
1.5 Diagnóstico da neurocisticercose humana	31
1.5.1 Neuroimagem	31
1.5.2 Ensaios imunológicos.....	32
1.6 Aplicação do antígeno heterólogo no diagnóstico da neurocisticercose humana	33
1.7 <i>Phage display</i>	35
1.8 Imunoglobulina Y	36
2. OBJETIVOS	39
2.1 Geral.....	39
2.2 Específicos	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Aspectos éticos.....	40
3.2 Obtenção dos parasitos e preparação do extrato salino total de <i>Taenia crassiceps</i>	40
3.2.1 Caracterização do extrato salino total de <i>T. crassiceps</i>	41
3.3 Animais	41
3.4 Produção dos anticorpos.....	41
3.4.1 Imunizações das galinhas e coleta dos ovos.....	41
3.4.2 Precipitação dos anticorpos IgY anti-Tc por sulfato de amônio	44
3.4.3 Isolamento dos anticorpos IgY anti-Tc	44
3.4.4 Confirmação da presença da imunoglobulina Y pós-isolamento	45
3.5 Caracterização dos anticorpos IgY.....	45
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
3.5.2 ELISA indireto para avaliação da cinética de produção dos anticorpos IgY	45
3.5.3 ELISA avidéz	46
3.5.4 <i>Immunoblotting</i>	47
3.6 Aplicação das IgY para reconhecimento antigênico e diagnóstico sorológico	47
3.6.1 Imunofluorescência.....	47
3.6.2 Detecção de imunocomplexos circulantes em soros humanos.....	48
3.6.2.1 Amostras de soros	48
3.6.2.2 Grupo I: amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo para neurocisticercose	48
3.6.2.3 Grupo II: amostras de soros de pacientes com outras infecções parasitárias	49
3.6.2.4 Grupo III: amostras de soros de indivíduos saudáveis	49

3.6.3 ELISA para detecção de imunocomplexos.....	50
3.7 <i>Phage display: Biopanning</i>	50
3.7.1 Seleção negativa.....	51
3.7.2 Seleção positiva.....	51
3.7.3 Amplificação dos clones	52
3.7.4 Determinação do título dos fagos eluídos	53
3.7.5 Validação dos clones selecionados.....	53
3.7.6 Avaliação da imunorreatividade dos clones de fagos selecionados	54
3.7.7 Extração e sequenciamento de DNA.....	55
3.8 Análise dos dados do sequenciamento por Bioinformática.....	55
3.9 Amplificação e purificação dos clones selecionados	56
3.10 Aplicação dos clones de fagos selecionados no imunodiagnóstico da neurocisticercose por <i>phage-ELISA</i>	56
3.11 Normas de biossegurança.....	57
3.12 Análise estatística.....	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Caracterização da preparação antigênica de <i>T. crassiceps</i>	58
4.2 Imunizações das galinhas, obtenção dos ovos e produção dos anticorpos fracionados	58
4.3 Isolamento dos anticorpos IgY anti-Tc	60
4.4 Caracterização dos anticorpos IgY anti-Tc	62
4.4.1 ELISA indireto	62
4.4.2 ELISA avidéz	63
4.4.3 Reconhecimento antigênico por <i>immunoblotting</i> e identificação do tecido parasitário por imunofluorescência indireta	63
4.5 Aplicação dos anticorpos IgYi anti-Tc.....	66
4.5.1 Detecção de imunocomplexos por ELISA	66
4.6 Seleção de fagos ligantes às moléculas de IgY	68
4.7 Extração e sequenciamento de DNA.....	73
4.8 <i>Phage-ELISA</i> no diagnóstico sorológico da NCC humana	77
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morfobiologia e ciclo de vida de *Taenia solium*

A espécie *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) pertence a classe Cestoda, que compreende aproximadamente 5000 espécies de parasitos hermafroditas. Em relação ao parasitismo humano, os cestódeos mais frequentemente encontrados pertencem a família Taenidae, na qual as espécies *T. solium* e *T. saginata* (Goeze, 1782) e potencialmente *Taenia asiatica* são ressaltadas (EOM; RIM, 1993; DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; GRIPPER; WELBURN, 2017).

A ingestão de carnes ou vísceras de suínos ou carne bovina, cruas ou malcozidas, infectadas com formas larvárias viáveis de *Taenia* sp. denominadas metacestódeas, são a causa de teníase no hospedeiro humano (GALÁN-PUCHADES; FUENTES, 2013; DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; WHITE Jr; GARCIA, 2018). A forma metacestódea *T. solium* é composta de uma membrana vesicular preenchida com líquido claro, contendo no seu interior um escólex invaginado com quatro ventosas, rostro armado e duas fileiras de ganchos; a de *T. saginata* apresenta as mesmas características morfológicas, exceto pela ausência de rostro. O metacestódeo ingerido pelo hospedeiro definitivo (homem) é estimulado por enzimas digestivas, causando a evaginação do escólex, que se fixa na mucosa do intestino delgado e desenvolve-se na forma adulta. O parasito adulto das espécies do gênero *Taenia* é dividido em escólex ou cabeça, colo ou pescoço e estróbilo ou corpo. A espécie *Taenia solium* apresenta comprimento médio de 1,5 a 4 metros, e seu crescimento ocorre a partir da proliferação de células no colo/pescoço, que se estende em segmentos denominados proglotes (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; GRIPPER; WELBURN, 2017; COYLE, 2019), que encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento (jovens, madura e grávidas), além de possuírem individualidade alimentar e reprodutiva (REY, 2008; DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016). Cada proglote contém cerca de 50.000 a 60.000 ovos, sendo os ovos e as proglotes grávidas distais liberados juntamente com as fezes (WILLMS, 2008; DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; COYLE, 2019).

Os seres humanos também podem desenvolver cisticercose ao serem expostos a contaminação fecal pela ingestão acidental de ovos viáveis de *T. solium* (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; GARCIA, 2018). Os ovos são esféricos, medem cerca de 30 µm de diâmetro, internamente são constituídos pelo embrião hexacanto ou oncosfera e, um envoltório denominado embrióforo forma sua parte externa; além disso, sua morfologia é indistinguível

entre as espécies de *Taenia* (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016). No intestino delgado, as oncosferas são ativadas e liberadas, penetram a vilosidade com auxílio dos ganchos e invadem os vasos sanguíneos, disseminando-se para vários tecidos, incluindo olhos, tecido subcutâneo, músculo e cérebro (DEL BRUTTO, 2012b; GRIPPER; WELBURN, 2017; COYLE, 2019). A infecção humana pode ocorrer por três mecanismos distintos: autoinfecção externa – por meio de mãos contaminadas de portadores de *T. solium* que eliminam proglotes e ovos ou pela coprofagia; autoinfecção interna – pela presença de proglotes grávidas ou ovos de *T. solium* que regressam para o estômago por meio de vômitos ou movimentos retroperistálticos do intestino, no estômago vão ser ativados, desenvolvendo o ciclo auto-infectante ao voltarem para o intestino delgado; heteroinfecção – pela ingestão de alimentos (verduras) ou água contaminados com ovos de *T. solium* provenientes das dejeções de outro indivíduo portador (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

Devido às modificações anatômicas e fisiológicas, os metacestódeos podem ser encontrados em diferentes estágios: i) estágio vesicular, no qual o cisticerco apresenta uma vesícula translúcida, com líquido incolor no seu interior e escólex preservado, podendo permanecer por alguns anos nesse estágio; ii) estágio coloidal, onde sinais de deterioração do escólex são observados e o líquido vesicular torna-se turvo devido à incapacidade de controle da resposta imune pelo parasito; iii) estágio granular, em que ocorre espessamento da membrana e mineralização do escólex e iv) estágio granular calcificado, no qual o parasito apresenta-se totalmente calcificado (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; FLEURY *et al.*, 2016; GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; GRIPPER; WELBURN, 2017).

1.2 Epidemiologia da neurocisticercose humana

Considerada uma zoonose reemergente, a neurocisticercose (NCC) ainda é um grande problema de saúde pública no mundo, com ampla prevalência em países de baixa renda, incluindo África Subsaariana, Ásia e América Latina (MARTINS-MELO *et al.*, 2016; TELLEZ-ZENTENO; HERNANDEZ-RONQUILLO, 2017). Regiões que apresentam saneamento precário, onde também a inspeção veterinária da carne é restrita e a criação extensiva de suínos é praticada, são endêmicas para a infecção (PRASAD *et al.*, 2011; CARABIN; WINKLER; DORNY, 2017). Segundo legislações vigentes na maioria dos países, os suínos infectados devem ser condenados por veterinários, no entanto, as carcaças infectadas são, muitas vezes, comercializadas e consumidas, uma vez que há falta de inspeção veterinária (ASSANA *et al.*, 2013).

Com base na variedade de dados disponíveis sobre prevalência de epilepsia, estima-se que 2,56-8,30 milhões de pessoas são acometidas pela NCC, considerando os casos assintomáticos e sintomáticos (WHO, 2019). Em regiões endêmicas para *T. solium*, aproximadamente 30% das convulsões são resultantes de paciente sintomáticos portadores de NCC, embora a maioria dos casos seja assintomático (GARCIA, 2018). Além disso, *T. solium* foi identificada como principal causa de mortes por doenças transmitidas por alimentos em 2015, o que resultou em 2,8 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) (WHO, 2019), calculados pela soma dos anos de vida perdidos devido à mortalidade prematura na população e dos anos perdidos por incapacidade para pessoas que vivem com a condição de saúde ou suas consequências (WHO, 2020).

O aumento da incidência de NCC em países de alta renda está atribuída ao aumento das taxas de imigração, e vem sendo observada particularmente nos EUA, Canadá e Europa (SORVILLO *et al.*, 2011; COYLE *et al.*, 2012; GRIPPER; WELBURN, 2017). As regiões sul e sudoeste dos EUA apresentam maiores taxas de NCC, uma vez que possuem grande número de imigrantes, oriundos da América Central e da América do Sul (CHO, 2018). Nesses países, a inexperiência em lidar com essas infecções parasitárias é um agravamento no risco de propagação do parasito (GRIPPER; WELBURN, 2017).

O número de formas metacestódeas varia de acordo com a localidade, uma vez que, geralmente, múltiplos metacestódeos viáveis são observados no cérebro de pacientes em regiões endêmicas, especialmente na América Latina, porém na Índia, a visualização de uma única e degenerada forma é mais comum (SINGH *et al.*, 2010; CHO, 2018).

Embora haja iniciativas para determinar a ocorrência de NCC em países endêmicos e em nações desenvolvidas, os dados para avaliação precisa da distribuição e transmissão da NCC são escassos, apesar do impacto global da doença (MEWARA; GOYAL; SEHGAL, 2013; FOGANG *et al.*, 2015; O'NEAL; FLECKER, 2015; GRIPPER; WELBURN, 2017).

No Brasil, segundo estudo realizado por MARTINS-MELO *et al.* (2016), a NCC é endêmica particularmente nas regiões sudeste, sul e centro-oeste, e apresenta taxa média anual de 0,82 óbitos/1.000.000 habitantes, sendo a taxa de mortalidade geral ajustada por idade de 0,97 óbitos/1.000.000 habitantes. Na região do Triângulo Mineiro (estado de Minas Gerais), uma provável endemicidade de cisticercose foi observada segundo estudo de SILVEIRA-LACERDA *et al.* (2002), o qual constatou soroprevalência em Araguari (13,5%), Tupaciguara (5,0%), Monte Alegre (4,8%), e Uberlândia (4,7%). O município de Jataí, no sudoeste de Goiás, também foi caracterizado como área endêmica para a doença, apresentando soroprevalência de 13,8%, (GUARDA; COSTA-CRUZ; BARCELOS, 2018). A ocorrência da NCC é

provavelmente subestimada, uma vez que a notificação compulsória da doença não é obrigatória e apenas alguns estados (Santa Catarina, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul) e o município de Ribeirão Preto implementaram programas de controle (TAKAYANAGUI *et al.*, 1996; TAKAYANAGUI; LEITE, 2001; AGAPEJEV, 2003; MARTINS-MELO *et al.*, 2016).

1.3 Resposta imunológica do hospedeiro

Na NCC, uma importante reação inflamatória é associada à doença e sua intensidade depende principalmente do estágio de desenvolvimento dos metacestódeos (CARPIO *et al.*, 2018). Assim, quando o parasito se encontra no estágio vesicular, a reação inflamatória ao seu redor é escassa, enquanto intenso infiltrado inflamatório é observado no estágio coloidal, com predominância de resposta inflamatória Th1 (IL-2, IL-6, IL-12, TGF- β e IFN- γ). No estágio granular, citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-18 e TGF- β) e Th 2 (IL-4, IL-13 e IL-10) são encontradas, e quando o metacestódeo se torna um nódulo calcificado, intensa gliose astrocítica ao seu redor é constatada (FLEURY *et al.*, 2016).

Diferenças entre a resposta inflamatória na NCC intra e extraparenquimal são observadas: a resposta imunológica é menos eficaz quando a doença é localizada fora do parênquima, visto que na NCC parenquimal o metacestódeo está em contato com as células imunes locais e circundado pelo tecido cerebral (CARPIO, 2018). Um perfil de citocinas pró-inflamatórias periféricas mediado por IFN- γ , IL-12 e IL-1 β está associado com NCC parenquimatosa, enquanto a doença subaracnóidea está associada com aumento de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (CHAVARRÍA *et al.*, 2005; GÓNGORA-RIVERA *et al.*, 2008; GONZALES; RIVERA; GARCIA, 2016).

Um papel importante na limitação da resposta inflamatória no SNC é provavelmente desempenhado pelas populações de células T reguladoras (Treg), bloqueando a inflamação pela produção de IL-10 e pelo contato célula a célula com células dendríticas, visto que as células Treg parecem estar expandidas nas infecções por cisticercose (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; ARCE-SILLAS *et al.* 2015; TUERO *et al.*, 2015; GONZALES; RIVERA; GARCIA, 2016).

A proliferação de linfócitos B murinos induzidos por extratos de tecido de *T. solium* sugerem que, *in vivo*, o parasito tem um efeito policlonal nos linfócitos B do hospedeiro (WILLMS, 2008). Segundo estudo realizado por CHAVARRÍA *et al.* (2005), existe relação entre a gravidade clínica da NCC e o aumento da celularidade no LCR, uma vez que, quando

comparados grupos de pacientes com as formas leve, moderada e grave da doença, níveis mais altos de IL-5, IL-10, IgG1, IgG2, IgG3 e IgE foram observados nos que apresentavam NCC grave. As imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE, induzidas pelo antígeno parasitário, são encontradas em elevada concentração no soro de pacientes com NCC (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016). Os anticorpos IgG destacam-se na resposta humoral, sendo detectados em amostras de soro e de LCR em níveis superiores às demais classes de imunoglobulinas (COSTA *et al.*, 1982; BUENO *et al.*, 2000a; PARDINI *et al.*, 2002). Níveis elevados de anticorpos foram correlacionados com a forma maligna da doença (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016).

A forma metacestódea é capaz de sobreviver durante anos por meio de alguns mecanismos de escape da resposta imune, tais como inibição do componente C1q pela ação da paramiosina e inibição das vias clássica e alternativa do complemento pela taenistatina. Além disso, a taenistatina inibe a resposta celular por aparentemente interferir na proliferação de linfócitos e na função dos macrófagos (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016). A destruição do cisticerco causa a liberação de grandes quantidades de citocinas, e, portanto, os efeitos patológicos, bem como a atividade epileptogênica, devem-se à resposta inflamatória (SOTELO; MARIN, 1987; GARCIA; RODRIGUEZ; FRIEDLAND, 2014; MOURA *et al.*, 2015).

1.4 Aspectos clínicos da neurocisticercose humana

Conhecida por suas variáveis manifestações clínicas, a NCC é a doença parasitária mais comum do sistema nervoso central humano (SNC). Sua natureza pleomórfica pode ser atribuída às características do parasito (número, estágio e localização) e do hospedeiro (idade, sexo e genética). No controle das interações imunes, o estágio de desenvolvimento do parasito é importante; o início de respostas imunes contra o metacestódeo degenerativo está geralmente associado ao desenvolvimento dos sintomas, no qual um perfil clínico correspondente é observado (GRIPPER; WELBURN, 2017; DELGADO-GARCÍA *et al.*, 2019).

Apesar desses fatores influenciarem a diversidade das manifestações da doença, a localização dos metacestódeos é, provavelmente, o fator mais importante na explicação da heterogeneidade do quadro clínico. A capacidade de localização do parasito em diversas áreas do SNC permitiu a classificação da doença em NCC parenquimatosa, na qual o parênquima cerebral ou sulcos de convexidade estão envolvidos; e NCC extra-parenquimatosa, na qual as formas são observadas em outras localidades, tais como cisternas basais, sistema ventricular, fissura de Sylvian e medula espinhal. Diferenças em relação às manifestações clínicas são

observadas de acordo com a classificação utilizada e com as variações genotípicas de *T. solium*. Em alguns casos, os pacientes podem apresentar a doença em ambas as localizações (GRIPPER; WELBURN, 2017; GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; CARPIO *et al.*, 2018; DELGADO-GARCÍA *et al.*, 2019).

O parênquima cerebral é mais comumente acometido pela NCC e, geralmente, apresenta prognóstico mais favorável do que a extra-parenquimatosa (GRIPPER; WELBURN, 2017). As principais manifestações clínicas observadas nessa classificação são convulsões ou déficits neurológicos focais, geralmente transitórios, provavelmente devido a três fases distintas de evolução do parasito, nas quais o mesmo pode ser encontrado vivo (fase ativa), em início de degeneração (fase transicional) ou se apresentar como um nódulo calcificado quando morto (fase inativa) (KELVIN *et al.*, 2011; CARPIO *et al.*, 2018). Apesar de serem muito frequentes em pacientes com metacestódeos em degeneração, convulsões (principal ou única manifestação da cisticercose cerebral parenquimatosa) têm sido observadas em pacientes com formas vesiculares e também na fase inativa da doença. Lesões calcificadas características foram identificadas por tomografia computadorizada (TC) em aproximadamente 25%-50% dos indivíduos hospitalizados com convulsões em áreas endêmicas. A liberação esporádica do antígeno ou seu reconhecimento pelo hospedeiro causando resposta inflamatória no cérebro são hipóteses desenvolvidas por muitos especialistas (NASH *et al.*, 2004; NASH *et al.*, 2008; GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; COYLE, 2019).

O crescimento irregular das formas metacestodeas, além da carga parasitária que pode ser maior na NCC extra-parenquimal resulta em um prognóstico negativo da doença. A presença de metacestódeos nos ventrículos ou cisternas causa hidrocefalia, responsável por aproximadamente 30% dos casos de hipertensão intracraniana (HIC); além disso, aracnoidite e ependimite também podem ocasionar o acúmulo de LCR. Manifestações como anormalidades neurais também são relatadas na forma extra-parenquimal da doença. Devido a uma alta taxa de mortalidade (50%) na presença de hidrocefalia proveniente da meningite causada pela cisticercose, são consideradas formas malignas da NCC as localizações extraparenquimais (intraventricular e cisternal). O prognóstico da doença subaracnóidea é pior quando observada a presença da forma racemosa, que pode invadir vários espaços cerebrais e ocasionar reações inflamatórias graves (DA SILVA; TAKAYANAGUI, 2016; GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; GRIPPER; WELBURN, 2017; CARPIO *et al.*, 2018).

A NCC espinhal é rara, contudo, os metacestódeos podem alcançar as meninges espinhais pelo LCR. A presença de metacestódeos no interior da medula espinhal ou o comprometimento extrínseco da mesma pode causar dores radiculares e fraqueza de membros

inferiores ou superiores (GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; GRIPPER; WELBURN, 2017).

1.5 Diagnóstico da neurocisticercose humana

O diagnóstico de NCC é realizado pela combinação de achados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de imagem (MACHADO *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2013; FOGANG *et al.*, 2015; SAKO *et al.*, 2015). Técnicas de neuroimagem, como TC e ressonância magnética (RM) são métodos preferidos para o diagnóstico de NCC, pois permitem a visualização do parasito e do processo reacional do hospedeiro (CARPIO; ESCOBAR; HAUSER, 1998; AMARAL *et al.*, 2003; MARTINS-MELO *et al.*, 2016; GRIPPER; WELBURN, 2017).

Del Brutto *et al.* (1996) estabeleceram um conjunto de critérios de diagnóstico para cisticercose humana (sistêmica e NCC) e, posteriormente, uma versão atualizada limitada ao diagnóstico da NCC foi proposta por Del Brutto *et al.* (2001). Com o objetivo de incluir melhorias no diagnóstico nos últimos anos e fornecer definições mais simples e funcionais, Del Brutto *et al.* (2017) publicaram uma versão revisada do conjunto de critérios de diagnóstico para NCC, no qual o critério absoluto para o diagnóstico da NCC inclui: a) demonstração histológica do parasito por biópsia de cérebro ou lesão da medula espinhal, b) visualização do cisticercos sub-retiniano, c) demonstração conclusiva de um escólex dentro de uma lesão cística em estudos de neuroimagem. A demonstração de um critério absoluto ou evidência acumulativa apoiando a infecção (NCC) estabelece o diagnóstico definitivo da doença (DEL BRUTTO *et al.*, 2017).

1.5.1 Neuroimagem

Os exames de imagem (TC e RM) permitem a observação quanto à presença, tamanho, número, estágio e localização do parasito. Além disso, respostas imunes do hospedeiro contra o parasito também podem ser visualizadas (DELGADO-GARCÍA *et al.*, 2019; GARCIA 2018). Na imagem, a membrana do metacésteo é pouco visualizada e o conteúdo intravesicular apresenta-se semelhante ao LCR, com mínima ou nenhuma inflamação circundante quando a presença de parasitos intraparenquimais viáveis é constatada. Após ser detectado pelo sistema imune do hospedeiro, o parasito causa inflamação, sendo observado o início da degeneração do metacésteo, que evolui para a forma coloidal, granular até se calcificar. (GOMES; COSTA-CRUZ, 2017; GARCIA, 2018). A TC apresenta maior sensibilidade na detecção de

metacestódeos calcificados, enquanto a RM, por possuir maior poder de resolução, é frequentemente superior na detecção da doença no espaço extraparenquimatoso, podendo evidenciar melhor o escólex e os metacestódeos localizados nos ventrículos (WHITE Jr, 2000; RAIBAGKAR; BERKOWITZ, 2018; COYLE, 2019).

A sensibilidade e especificidade da RM foram melhoradas pelo desenvolvimento de sequências tridimensionais, como FIESTA (*Fast imaging employing steady-state acquisition*) e CISS (*3D constructive interferences steady state*), especialmente para as formas presentes no espaço subaracnóideo e ventricular. O reconhecimento dos escólices em casos que não são visualizados com sequências convencionais é realizado por imagens ponderadas por difusão e FIESTA (WHITE Jr; GARCIA, 2018; COYLE, 2019).

Os fatores econômicos restringem o acesso a neuroimagem, uma vez que esse tipo de exame é caro e requer recursos tecnológicos e pessoal treinado, indisponíveis na maioria dos países de baixa renda nos quais a NCC é endêmica; muitas vezes, apenas a TC é disponibilizada. Além disso, a principal população de risco é, na maioria das vezes, rural, e o alto custo dessas tecnologias dificulta o acesso à este tipo de diagnóstico (GARCIA; DEL BRUTTO, 2003; RAJKOTIA *et al.*, 2007; GRIPPER; WELBURN, 2017; GARCIA, 2018).

1.5.2 Ensaios imunológicos

O imunodiagnóstico é uma ferramenta acessível, de baixo custo, que permite a detecção de antígenos, anticorpos e imunocomplexos em áreas endêmicas, auxiliando no diagnóstico em pacientes cujo perfil clínico e de imagem são compatíveis com NCC (MICHELET *et al.*, 2011; CARRARA *et al.*, 2020). Assim, imunoenaios como ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e *immunoblotting* são comumente usados para detectar anticorpos contra antígenos de *Taenia* spp. nas amostras de LCR (COSTA *et al.*, 1982; COSTA, 1986; FLEURY *et al.*, 2003; BARCELOS *et al.*, 2005; BARCELOS *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2010), soro (RIBEIRO *et al.*, 2010; MANHANI *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2014) e/ou saliva (BUENO *et al.*, 2000a; MALLA *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2010). Apesar de auxiliar no diagnóstico, a detecção de anticorpos apresenta limitações. Quando utilizado o antígeno bruto, taxas significativas de reações cruzadas com outras infecções parasitárias frequentes em regiões endêmicas da cisticercose são observadas, como no caso da doença hidática e himenolepíase. Além disso, indivíduos de populações endêmicas podem apresentar reação positiva para a presença de anticorpos devido a infecções fora do SNC, por exposição sem infecção, por infecções resolvidas espontaneamente ou mesmo por transferência

passiva de suas mães (GARCIA, 2018).

Devido a capacidade dos anticorpos de persistirem após eliminação dos parasitos, a detecção de antígenos é vantajosa por sua especificidade para o diagnóstico de metacestódeos viáveis (CARPIO *et al.*, 2018). Ensaio ELISA baseado em anticorpos monoclonais foram realizados com o objetivo de detectar o antígeno parasitário, sendo observada menor sensibilidade na detecção de antígenos do que na de anticorpos e frequentes resultados negativos em indivíduos com poucas formas no cérebro (GARCIA, 2018). Ressalta-se que pacientes com mais de um parasito que apresentarem sorologia negativa devem ser investigados por diagnósticos alternativos (COYLE, 2019). Para que os resultados sejam interpretados com maior segurança, o emprego de dois testes imunológicos é recomendado, sendo um de elevada sensibilidade e outro de elevada especificidade (COSTA-CRUZ, 1995; VAZ; LIVRAMENTO, 1996; DEL BRUTTO, 2012b).

A detecção de imunocomplexos circulantes tem sido empregada com sucesso no diagnóstico de helmintos (GONÇALVES *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; CARRARA *et al.*, 2020). Os imunocomplexos, formados pela ligação do anticorpo ao antígeno, representam um importante mecanismo de defesa do organismo, uma vez que impede a deposição de antígenos e os consequentes danos causados aos tecidos do hospedeiro por meio da neutralização, eliminação e inativação antigênica (BARNETT, 1986; LOPES *et al.*, 2019). Sua detecção é de grande importância clínica, pois indica que existe o risco de lesões patológicas por deposição dos imunocomplexos, que existe um potencial de interação entre os mesmos e outros sistemas do hospedeiro e que a resposta humoral está em andamento (PHILIPS, 1989).

1.6 Aplicação do antígeno heterólogo no diagnóstico da neurocisticercose humana

A busca por fontes antigênicas alternativas devido à dificuldade de obtenção dos metacestódeos, a partir de suínos naturalmente infectados (ARRUDA *et al.*, 2005), resultou na utilização de metacestódeos de *Taenia saginata* (OLIVEIRA *et al.*, 2009, NUNES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2013) e de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) (LARRALDE *et al.*, 1989; BARCELOS *et al.*, 2001; BUENO *et al.*, 2001; PARDINI *et al.*, 2002; DORNY *et al.*, 2003; BARCELOS *et al.*, 2005; ESPÍNDOLA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2007; MATOS-SILVA *et al.*, 2012; HAMAMOTO FILHO *et al.*, 2015; GARCÍA-MONTOYA *et al.*, 2016). *T. crassiceps* representa importante fonte de antígenos devido à similaridade antigênica previamente descrita com *T. solium* (GARCIA; ORDOÑEZ; SOTELO, 1995; VAZ *et al.*, 1997;

BUENO *et al.*, 2000b; ESPÍNDOLA *et al.*, 2002; ISHIDA *et al.*, 2003; RASSY *et al.*, 2010; MORALES *et al.*, 2011). Estudos prévios relataram a aplicação de antígenos heterólogos no diagnóstico imunológico da cisticercose e NCC humana (VAZ *et al.*, 1997; VAZ, 2007; TOGORO; SOUZA; SATO, 2012; GARCÍA-MONTOYA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; CARRARA *et al.*, 2020).

Taenia crassiceps é um cestódeo cosmopolita pertencente à família Taeniidae, possui ciclo de vida de transmissão zoonótica, incluindo raposas, cães e felídeos como hospedeiros de sua forma adulta (FREEMAN, 1962; LESCANO; ZUNT, 2013). O parasito adulto abriga-se no intestino delgado, os ovos são liberados nas fezes e, posteriormente, ingeridos por roedores selvagens. Nos roedores, as oncosferas alojam-se nos tecidos e diferenciam-se no estágio larval após atravessar o epitélio intestinal (WILLMS, ZURABIAN, 2010). A localização dos metacestódeos em roedores é subcutânea, no músculo, sendo o estágio larval encontrado em camundongos, coelhos e outros roedores, que se comportam como hospedeiros intermediários (FREEMAN *et al.*, 1973; WÜNSCHMANN *et al.*, 2003)

A raridade de infecções humanas por *T. crassiceps* (cepa ORF), similaridade antigênica com *T. solium* e a possibilidade de manutenção em modelo de laboratório (camundongos fêmea da linhagem BALB/c) permitiram a fácil manutenção experimental do parasito. A reprodução do estágio larval deste ocorre de forma assexuada no peritônio, onde brotam exogenamente e geram novos brotos fora da vesícula dos metacestódeos. (WILLMS; ZURABIAN, 2010; SCIUTTO; FRAGOSO; LARRALDE, 2011; LESCANO; ZUNT, 2013; GARCÍA-MONTOYA *et al.*, 2016).

A cisticercose humana causada por *T. crassiceps* é incomum; no entanto, a possibilidade de NCC humana não é completamente improvável. A transmissão humana pode estar associada à um cão de estimação, uma vez que acredita-se que a ingestão de água ou alimentos contaminados pelas fezes seja a via de transmissão para os hospedeiros intermediários (AROCKER-METTINGER *et al.*, 1992; HELDWEIN *et al.*, 2006; LESCANO; ZUNT, 2013). A infecção por *T. crassiceps* pode ocorrer em indivíduos imunocomprometidos, como pessoas com a síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immunodeficiency syndrome – AIDS*) ou malignidade, sendo observada principalmente nos braços, e deve ser considerada quando formas metacestódeas de *T. solium* forem descartadas. Em indivíduos imunocompetentes o parasito infecta os olhos, no entanto, metacestódeos subcutâneos na área paravertebral foram observados em um paciente (FRANÇOIS *et al.*, 1998; HELDWEIN *et al.*, 2006; LESCANO; ZUNT, 2013).

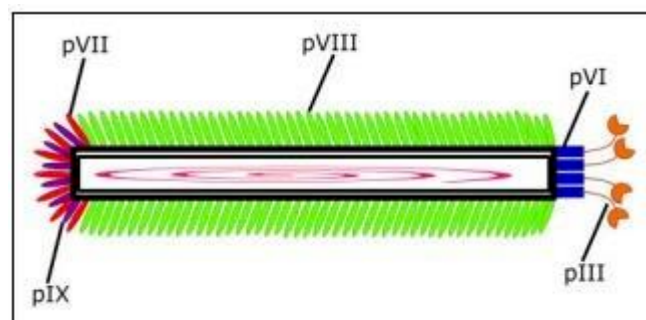
1.7 Phage display

Descrita inicialmente por Smith em 1985, *phage display* é uma tecnologia na qual peptídeos ou fragmentos de anticorpos, fusionados às proteínas do revestimento viral, são expressos na superfície do capsídeo de um bacteriófago (SIOUD, 2019; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019). Para que a proteína codificada seja expressa na superfície do fago, sequências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos (AZZAY; HIGHSMITH, 2002).

Os bacteriófagos (M13, fd, T4, T7, entre outros) pertencem à família Inoviridae, que infectam *Escherichia coli*, sendo o bacteriófago M13 o fago filamentoso mais frequentemente utilizado, uma vez que possui grande capacidade de replicação e é capaz de acomodar amplos e diferentes DNAs, além disso, saem das bactérias sem lisar a célula, induzindo preferencialmente a produção e secreção de partículas virais pela bactéria infectada (BENHAR, 2001; AZZAY; HIGHSMITH, 2002; SIOUD, 2019; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019). O vetor M13 é composto por cinco proteínas estruturais presentes no capsídeo (pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX) e DNA genômico circular de fita simples (ssDNA) que codifica as proteínas (Figura 1).

Os peptídeos geralmente são fusionados à extremidade N-terminal das proteínas pIII (3-5 cópias/fago) e pVIII (2700 cópias/fago), frequentemente utilizadas para expressão por selecionarem ligantes de alta afinidade. Os fragmentos peptídicos variam de 6 a 43 aminoácidos (aa) de comprimento e as bibliotecas peptídicas são geradas pela inserção de sequências randômicas de DNA em um fago (SIOUD, 2019; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019). As novas partículas de fago são montadas no espaço periplasmático da bactéria após a ligação da proteína pIII ao *pilus F* de *E. coli* (BENHAR, 2001; BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Figura 1. Estrutura do fago filamentoso utilizado na técnica de *phage display* (ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019).



A primeira etapa para a seleção de um ligante específico é o preparo da biblioteca peptídica de *phage display*, visto que a diversidade da biblioteca e o tamanho da inserção estão relacionados com a probabilidade de seleção de sequências que ligarão a um determinado alvo (NOREN; NOREN, 2001; WU *et al.*, 2016; MIMMI *et al.*, 2019; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019). A biblioteca peptídica de *phage display* pode conter $10^8 - 10^{11}$ sequências únicas de aa resultantes de inserções randômicas de nucleotídeos. Um amplo e diversificado painel de peptídeos aleatórios pode ser obtido a partir da alteração das sequências de aa, viabilizando a construção de bibliotecas de enzimas, peptídeos, fragmentos de anticorpos ou proteínas (ARAP, 2005; KRUMPE; MORI, 2007; PANDE; SZEWCZYK; GROVER, 2010; ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019).

O processo de seleção de ligantes específicos é denominado *biopanning*. Os bacteriófagos com sequências peptídicas aleatórias expressas na superfície são expostos ao alvo, e, os que permanecem ligados ao alvo após lavagem (alta afinidade) são amplificados em *E. coli*, transmitindo assim seu genótipo e fenótipo no próximo ciclo de seleção. São realizados ciclos sequenciais de *biopanning*, e, após cada ciclo, a avaliação do título de fagos eluídos é realizada. Os clones de fagos são sequenciados para identificação de suas sequências de aminoácidos e podem ser testados por ELISA e/ou citometria de fluxo, para a confirmação da especificidade do fago (MIMMI *et al.*, 2019).

A técnica de *phage-display* pode ser utilizada no estudo de várias doenças parasitárias (LANZILLOTTI; COETZER, 2008; COELHO *et al.*, 2015; LEVENHAGEN *et al.*, 2015; FELICIANO *et al.*, 2014; FELICIANO *et al.*, 2016), sendo potencialmente aplicável na identificação de peptídeos relevantes no diagnóstico da neurocisticercose humana (HELL *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2010; MANHANI *et al.*, 2011).

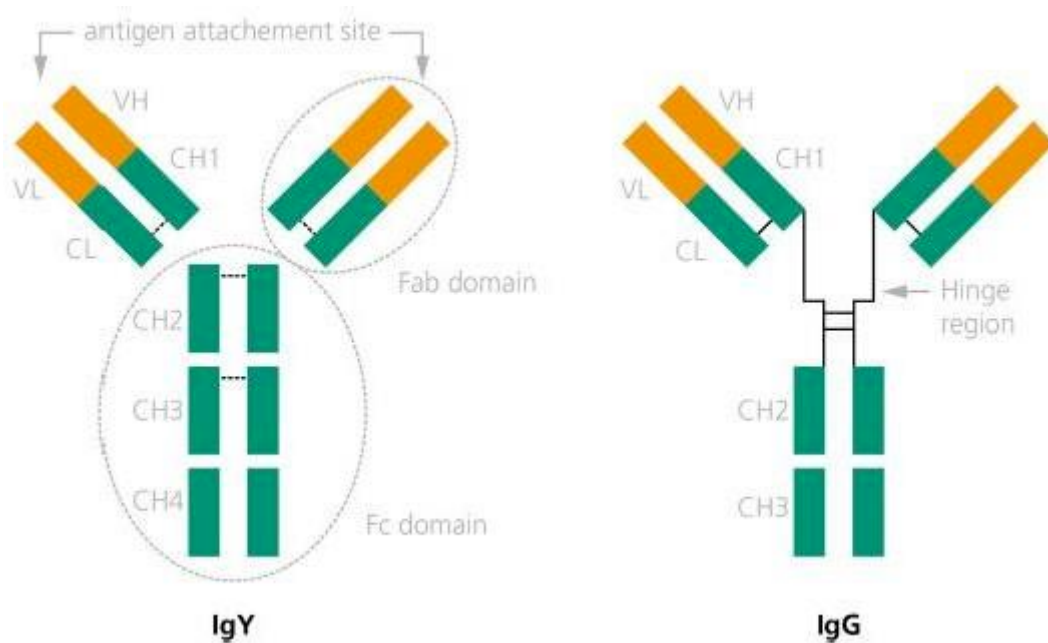
1.8 Imunoglobulina Y

As imunoglobulinas (Igs) são moléculas proteicas que consistem no principal produto efetor da imunidade humoral, as quais são secretadas por células plasmáticas em resposta à exposição a antígenos (MUNHOZ *et al.*, 2014; AMRO; AL-QAISI; AL-RAZEM, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). Em mamíferos, cinco classes de Igs são conhecidas: IgG, IgA, IgM, IgE e IgD; no entanto, apenas três classes são reconhecidas em aves: IgA, IgM e IgY (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008; MUNHOZ *et al.*, 2014).

A IgY é o principal anticorpo presente no sangue aviário, sendo transferida para a gema do ovo, onde se acumula. Apesar da semelhança funcional com a IgG de mamíferos, a principal

diferença entre IgY e IgG é observada nas cadeias pesadas: IgY possui quatro domínios constantes, enquanto IgG possui três (Figura 2), o que confere à IgY maior peso molecular (180 kDa) quando comparada com IgG (150 kDa). Devido à ausência da região de dobradiça entre os domínios CH1 e CH2, a IgY apresenta menor flexibilidade que a IgG. Outro fator limitante da flexibilidade de IgY é a presença de resíduos de glicina e prolina nas regiões CH1-CH2 e CH2-CH3 (MUNHOZ *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019; THIRUMALAI *et al.*, 2019). Diferenças no pH em relação ao ponto isoelétrico também são observadas (IgY - pH entre 5,7-7,6; IgG - pH 6,1-8,5) (DÁVALOS-PANTOJA *et al.*, 2000; THIRUMALAI *et al.*, 2019).

Figura 2. Estrutura do anticorpo IgY frente ao anticorpo IgG (MÜLLER *et al.*, 2015).



O interesse pela IgY vem crescendo devido à busca de redução e aprimoramento do uso de animais e de técnicas mais eficientes e econômicas. A obtenção de IgY a partir da gema de ovo é um método não invasivo, o custo de manutenção de uma galinha é menor do que a manutenção de animais como coelhos e camundongos e uma quantidade maior de anticorpos em comparação com outros animais é produzida (PEREIRA *et al.*, 2019). Além disso, uma pequena quantidade de antígeno é necessária para o desenvolvimento de forte resposta imune. Outras propriedades importantes de IgY são a ausência de ligação à superfície celular, proteínas estafilocócica A e estreptocócica G ou fatores reumatoides, ausência de ativação do sistema de complemento, além de não reagirem de forma cruzada com receptores Fc de mamíferos. Assim, o uso dessa classe de anticorpos em ensaios imunológicos envolvendo soros de mamíferos pode diminuir a ocorrência dos resultados falso-positivos (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON,

2004; MÜLLER *et al.*, 2015; THIRUMALAI *et al.*, 2019).

Estudos prévios têm demonstrado a aplicabilidade desses anticorpos em imunizações passivas de humanos e animais, testes de diagnóstico, reconhecimento antigênico de alvos e na neutralização de toxinas de veneno de serpente (SHIN *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2009; ARAUJO *et al.*, 2010; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; NIE *et al.*, 2014; DUAN *et al.*, 2016; TEIMOORI *et al.*, 2017; BORGES *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; CARRARA *et al.*, 2020).

Assim, devido ao importante problema de saúde pública que a cisticercose humana representa em áreas que apresentam condições sanitárias e políticas de saúde pública precárias, bem como em países desenvolvidos que recebem imigrantes de regiões onde a prevalência da teníase é elevada (TOGORO; SOUZA, SATO, 2012), e, levando-se em consideração que antígenos de metacestódeos de *T. crassiceps* substituem eficientemente os antígenos de metacestódeos de *T. solium* no imunodiagnóstico da NCC (LARRALDE *et al.*, 1989; VAZ *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2017), o presente estudo visa a produção de anticorpos IgY policlonais específicos anti-formas metacestódeas de *T. crassiceps* utilizando métodos baratos, de fácil reprodução e com alto grau de rentabilidade de anticorpos, para o reconhecimento antigênico do parasito e de imunocomplexos em amostras de soro de pacientes com NCC confirmada, além de serem aplicados no diagnóstico sorológico da NCC após seleção de peptídeos miméticos (mimotopos) de seus ligantes por *phage display*, objetivando o desenvolvimento de uma ferramenta com potencial aplicação no diagnóstico sorológico da NCC humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi produzir, fracionar, isolar e caracterizar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas inoculadas com extrato salino total de formas metacestódeas de *T. crassiceps*. Os anticorpos produzidos foram aplicados no reconhecimento de proteínas antigênicas, de tecido do estágio larval do parasito e na detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose confirmada. Os anticorpos IgY também foram utilizados na seleção de peptídeos ligantes por *phage display* para posterior aplicação no imunodiagnóstico da NCC.

2.2 Específicos

- Imunizar galinhas de postura com proteínas antigênicas do extrato salino total de formas metacestódeas de *T. crassiceps* (Tc);
- Obter e isolar os anticorpos IgY policlonais provenientes da gema de ovos de galinhas imunizadas;
- Caracterizar os anticorpos IgY anti-Tc quanto à especificidade, cinética de produção e maturação da avidéz por ELISA indireto;
- Avaliar o reconhecimento de antígenos presentes na forma parasitária em reações de imunofluorescência indireta pela IgY isolada em cortes histológicos de formas metacestódeas de *T. crassiceps*;
- Realizar o reconhecimento antigênico pelos anticorpos IgY isolados por meio de *immunoblotting*;
- Aplicar os anticorpos IgY isolados (anti-Tc) na detecção de imunocomplexos em soros de pacientes com NCC confirmada;
- Selecionar peptídeos com afinidade de ligação aos anticorpos selecionados (IgY anti-Tc e IgY anti-dTc) por *phage display*;
- Sequenciar os fagos selecionados para aplicação no imunodiagnóstico da NCC humana;
- Confirmar o potencial dos fagos selecionados no diagnóstico da NCC humana por meio do ensaio *phage-ELISA*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Julia Maria Costa-Cruz e em parceria com o Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho. O manejo e a utilização dos animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes de ética animal e aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU (CEUA/UFU 094/16).

A manutenção experimental da cepa de *T. crassiceps* foi realizada em camundongos fêmea da linhagem BALB/c na Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz e sob aprovação do Comissão de Ética na Utilização de Animais/UFU (CEUA/UFU 096/14). As galinhas foram imunizadas e mantidas sob a 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 Universidade de Uberaba (Uniube) em Uberaba-MG.

3.2 Obtenção dos parasitos e preparação do extrato salino total de *Taenia crassiceps*

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) foram experimentalmente infectadas com formas metacestódeas viáveis de *T. crassiceps* (cepa ORF). Após três meses, os animais foram eutanasiados utilizando *overdose* de anestésicos (Cloridrato de ketamina 10% e Cloridrato de xilazina 2%) foi realizado para obtenção dos metacestódeos localizados na cavidade peritoneal desses animais.

O extrato salino total de *T. crassiceps* foi preparado de acordo com Silva *et al.* (2017), com modificações. Aproximadamente 300 metacestódeos foram ressuspensos em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 mol/L, pH 7,2, 5 mL) acrescida de inibidores de protease (mini-ULTRacompleta, Roche, Mannheim, Alemanha) e rompidos em cinco ciclos de maceração, com a utilização de nitrogênio líquido. Posteriormente, a suspensão foi submetida a centrifugação, o sobrenadante colhido e a dosagem proteica realizada pelo método de Lowry *et al.* (1951).

3.2.1 Caracterização do extrato salino total de *T. crassiceps*

O perfil proteico do extrato salino de *T. crassiceps* foi analisado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições não redutoras, segundo Laemmli (1970). O preparo do gel foi realizado utilizando um suporte do sistema completo de cuba eletroforética vertical (SE 300 miniVE, EUA). Inicialmente, a preparação antigênica foi diluída em tampão de amostra 10x e submetida à 100 °C por cinco minutos em banho-maria, antes da aplicação no gel. As proteínas foram separadas em géis de concentração 12% (tampão Tris-HCl 0,375 M [pH 8,8]; dodecilsulfato de sódio [SDS] 0,1M; EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1]; tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). A eletroforese foi conduzida em sistema completo vertical [SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com corrente contínua de 20 mA/gel e tampão de corrida Tris-glicina-SDS (25 mM Tris, 192 mM glicina, 5,5 mM SDS).

O marcador padrão de peso molecular (RECOM BLUE Wide Range Protein Marker, Real Biotech, Taiwan) foi utilizado para identificação dos pesos molares em kiloDaltons (kDa) das bandas polipeptídicas. O gel foi submetido ao processo de coloração com *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Sigma-Aldrich, EUA).

3.3 Animais

Para a produção de anticorpos IgY policlonais, quatro galinhas de postura *Gallus gallus domesticus* da linhagem *Isa Brown* (25 semanas de idade) foram utilizadas. As galinhas foram alojadas 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 extrato salino total de formas metacestódeas de *T. crassiceps*;

Grupo II – duas galinhas imunizadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

3.4 Produção dos anticorpos

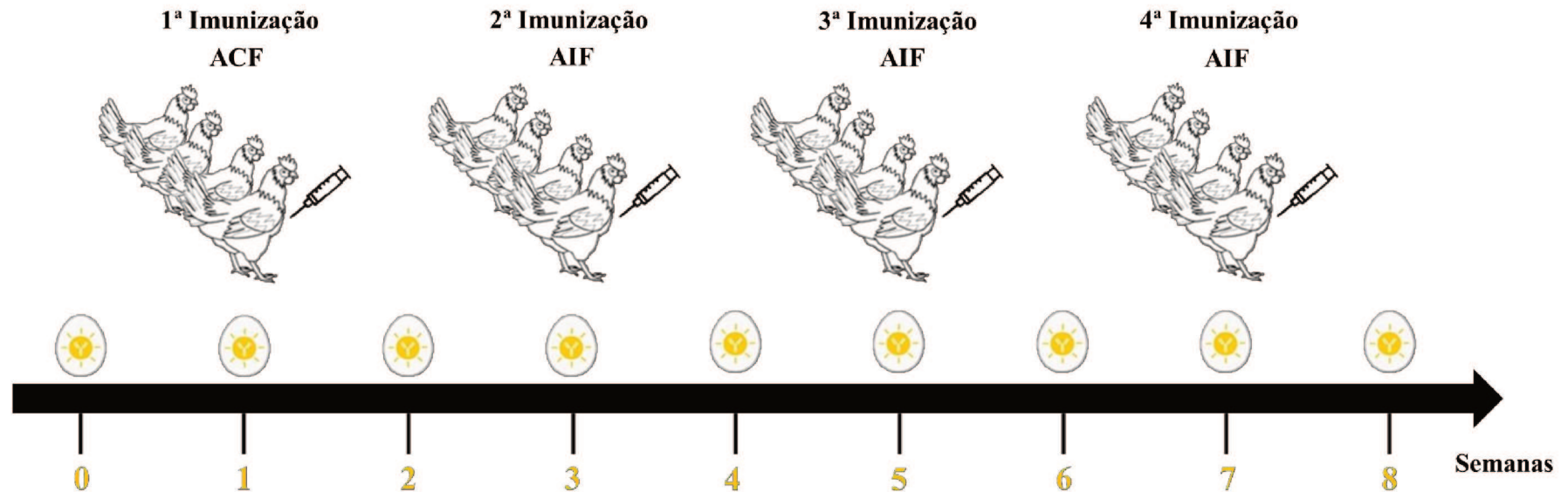
3.4.1 Imunizações das galinhas e coleta dos ovos

As imunizações das galinhas para a produção de anticorpos IgY anti-*T. crassiceps* (anti-Tc) e coleta dos ovos estão demonstradas na figura 3. Todos os ovos foram identificados de acordo com a semana de coleta e armazenados a 4 °C. Posteriormente, as cascas foram

higienizadas com etanol 70%, as gemas foram lavadas com água destilada e as membranas vitelínicas rompidas. As gemas correspondentes à cada semana de coleta foram reunidas em um mesmo tubo tipo Falcon para formar o *pool* semanal para posterior utilização e as claras foram descartadas.

Figura 3. Imunizações, coleta de ovos e sangue das galinhas. ACF: adjuvante completo de Freund; AIF: adjuvante incompleto de Freund.

As galinhas foram imunizadas com 100 µg extrato salino total de *T. crassiceps* (GI, n = 2) e com PBS (GII, n = 2) nas semanas 1, 3, 5 e 7. As imunizações foram realizadas via intramuscular, em diferentes pontos do músculo peitoral, nas quais um volume total de 500 µL (250 µL de Tc em PBS + 250 µL de adjuvante completo/incompleto de Freund) foi utilizado. Os ovos foram coletados semanalmente durante a experimentação, com início uma semana antes da primeira imunização (semana 0, pré-imune). Amostras de sangue foram coletadas semanalmente para acompanhamento da soroconversão.



3.4.2 Precipitação dos anticorpos IgY anti-Tc por sulfato de amônio

O fracionamento dos anticorpos IgY anti-Tc foi realizado de acordo com o método de diluição em água descrito por Akita e Nakai (1993), consistindo a primeira etapa na delipidação das gemas. O *pool* semanal das gemas foi diluído em água ultrapura na proporção de 1:15, o composto foi mantido sob agitação constante por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) e o pH foi ajustado para 5,5 pela adição do tampão acetato de sódio 0,06 M (pH 4,8). A solução foi homogeneizada *overnight* em agitador magnético à 4 °C e, após, centrifugada (800 x g, 40 min, 4 °C). O sobrenadante foi coletado, filtrado em papel filtro e o pH foi ajustado para 7,4 por meio da adição de hidróxido de sódio 0,1 M.

Após a etapa de delipidação, foi realizada a precipitação das proteínas da solução, adicionando-se ao volume final do sobrenadante coletado sulfato de amônio a 20% (m/v) (Sigma-Aldrich, EUA). A mistura foi mantida sob agitação lenta por 45 min a 4 °C e posteriormente centrifugada (2000 x g, 20 min, 4 °C). O precipitado enriquecido com IgY fracionada (IgYf) foi recuperado e ressuspenso em PBS (na proporção de 1:10 do volume inicial da solução delipidizada). As IgYf foram dosadas a 280 nm em espectrofotômetro (Biodrop μ Lite, Reino Unido).

3.4.3 Isolamento dos anticorpos IgY anti-Tc

Para o isolamento dos anticorpos IgY anti-Tc, amostras de IgYf da sexta e oitava semana, selecionadas de acordo com testes preliminares, foram submetidas à cromatografia líquida de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Os anticorpos foram lavados e concentrados com tampão fosfato de sódio 0,02 M em um sistema de ultrafiltração (EMD Millipore, EUA) com uma membrana com corte de 30 kDa (Amicon YM 30, Sigma-Aldrich Co., EUA) e, depois, foram dialisados contra uma solução de sulfato de potássio 0,5 M (pH 7,4). Após concentração das amostras, as mesmas foram aplicadas em uma coluna (*HiTrap IgY Purification HP*, 5 mL, GE Healthcare, EUA) previamente equilibrada com os tampões anteriormente mencionados (fosfato de sódio e sulfato de potássio); a eluição dos anticorpos foi realizada em fluxo de 1 mL/min usando um gradiente linear de tampão fosfato de sódio 0,02M (pH 7,5). As IgY isoladas (IgYi) foram dialisadas com água ultrapura e concentradas em um sistema de ultrafiltração (Amicon YM 15, Sigma-Aldrich Co., EUA) e a concentração das IgYi foi determinada a 280 nm (BioDrop, Reino Unido).

3.4.4 Confirmação da presença da imunoglobulina Y pós-isolamento

A confirmação da presença de IgY nas amostras após o isolamento foi realizada por *dot blot*. Para tal fim, membranas de nitrocelulose de 0,45 μm (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha) foram sensibilizadas com 10 μL de um *pool* das amostras isoladas, secas à TA e bloqueadas com PBS acrescido de Tween 20 0,05% e leite desnatado 5% (PBS- T-M 5%), por 2 h à TA, sob agitação lenta. Posteriormente, as membranas foram lavadas seis vezes com PBS acrescido de Tween 20 0,05% (PBS-T). As IgYi foram detectadas pela adição de anticorpos IgG produzido em coelhos anti-IgY, marcados com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), na diluição de 20.000, em PBS-T-M 1%, e incubadas por duas horas a TA, sob agitação lenta. Após novo ciclo de lavagem com PBS-T, a reação foi revelada pela adição 10 mg 3,3' – *diaminobenzidino tetrahydrocloroto* (DAB, Sigma, EUA) diluído em 15 mL de solução salina tamponada com Tris (TBS) e 12 μL de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma-Aldrich, EUA). A interrupção da revelação foi realizada por meio da adição de água destilada. Como controle negativo foi utilizada albumina sérica bovina (BSA) 1% nas mesmas condições.

3.5 Caracterização dos anticorpos IgY

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As IgY anti-Tc pós fracionamento e isolamento foram analisadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras, de acordo com o item 3.2.1. Os anticorpos IgY (10 μg) foram diluídos em tampão de amostra (Tris- HCl 100 mM [pH 6,8] + SDS 4% + azul de bromofenol 0,2% + glicerol 20%) com acréscimo de 2-mercaptoetanol 5% (Sigma-Aldrich, EUA) e submetidas à 100 °C por cinco minutos em banho-maria, antes da aplicação no gel.

3.5.2 ELISA indireto para avaliação da cinética de produção dos anticorpos IgY

A cinética de produção dos anticorpos IgY anti-Tc, provenientes das gemas dos ovos, foi determinada por meio do teste ELISA indireto, como previamente descrito por Faria *et al.* (2019), com modificações. Ensaio preliminares foram realizados para determinar condições ótimas para a obtenção do ensaio com maior razão sinal/ruído. Microplacas de poliestireno de baixa afinidade, 96 poços (Greiner Bio-One, Austria), foram utilizadas como suporte para

adsorção do extrato salino total de *T. crassiceps*. A adsorção do antígeno foi realizada na concentração de 5 µg/mL a um volume final de 50 µL/poço em tampão carbonato/bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), e a placa foi então incubada *overnight* a 4 °C. Posteriormente, os poços foram bloqueados com PBS-T-M 1% durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, as amostras de IgYf anti-Tc (2 µg/poço) foram diluídas em PBS-T-M 1% (50 µL/poço), adicionadas em duplicata e incubadas por 1 h a 37 °C. Em seguida, o anticorpo secundário, produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionado na diluição 1:15.000 em PBS-T-M 1% (50 µL/poço) e incubado por 1 h a 37 °C. A reação foi revelada pela adição de 50 µL/poço do substrato H₂O₂ (Merck, Alemanha) diluído em solução cromógena de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Co., EUA), preparado no momento de uso (0,005 g de OPD + 12,5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,5 + 5 µL de H₂O₂ 30%). Após incubação (10 min, TA, ao abrigo da luz) a reação foi interrompida com a adição de 25 µL da solução de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄ 2N). Entre cada etapa da reação, os poços foram lavados três vezes com PBS-T. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 492 nm em um leitor de microplacas (Biotek, EUA).

A densidade óptica (DO) média dos anticorpos provenientes do *pool* de gemas das oito semanas distintas oriundas das galinhas do grupo controle (imunizadas com PBS) foram utilizadas como controle negativo para estabelecer o valor do *cut-off*. Os resultados foram expressos como índice ELISA (IE) = $DO/cut-off$ de controles negativos mais três desvios padrão. Valores de IE > 1,0 foram considerados positivo.

3.5.3 ELISA avidéz

A maturação de avidéz dos anticorpos IgY anti-Tc foi investigada pelo tratamento dos imunocomplexos formados com ureia 6M, seguida pela determinação da atividade residual dos anticorpos por meio de ELISA indireto. Após a etapa de incubação dos anticorpos IgY policlonais (quadruplicata) com o extrato salino total de *T. crassiceps* (5µg), uma duplicata foi incubada com 50 µL de solução de ureia 6 M (Synth, Brasil) diluída em PBS (pH 7,2), e a outra duplicata incubada com PBS-T, durante 5 min a TA. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação com anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:15.000 em PBS-T-M 1%, por 1 h a 37 °C. As etapas de revelação, interrupção e determinação dos valores de absorbância da reação foram realizadas de acordo com o item 3.5.2. Os resultados foram expressos em porcentagem como índice de avidéz (IA), calculado como a razão entre a

absorbância (Abs) obtida nos anticorpos tratados com ureia (U+) e dos não tratados com ureia (U-), de acordo com a fórmula: $IA = \text{Abs U+}/\text{Abs U-} \times 100$. O índice de avidéz foi considerado alto quando $AI > 60\%$ (CARRARA *et al.*, 2020).

3.5.4 Immunoblotting

O reconhecimento de proteínas antigênicas a partir do *pool* de anticorpos IgYi foi investigado por ensaios de *immunoblotting*. Inicialmente, 250 µg de extrato salino total de *T. crassiceps* foram separados por SDS-PAGE em géis 12%, em condições não redutoras, conforme descrito no item 3.2.1. As proteínas separadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose 0,45 µm (Bio-Rad Laboratories Inc., Alemanha), de dimensões: 8 cm de largura x 6 cm de altura, utilizando um sistema de transferência úmido (SE 300 miniVE, Hoefer, EUA) com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%), e corrente contínua de 300 mA, por 1 h e 40 min. Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (Sigma-Aldrich, EUA) para visualização das bandas proteicas. Em seguida à visualização, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras de 3 mm de largura e bloqueada com PBS-T-M 5%, por 2 h à TA. Após o bloqueio, o *pool* de anticorpos IgYi anti-Tc (20 µg), diluído em PBS-T-M 1%, foi adicionado, e incubado *overnight* a 4 °C, sob agitação. Na sequência, as tiras foram incubadas por 2 h à TA com o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., EUA), diluído 1:5.000 em PBS-T-M 1%. O ensaio foi desenvolvido pela adição de 3,3' - *diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate* e *urea hydrogen peroxide tablets* (DAB-Sigma Fast tablets, Sigma-Aldrich Co., EUA) diluídos em 5 mL de água ultrapura e interrompido pela adição de água destilada. Entre cada etapa de incubação, as tiras foram lavadas seis vezes com PBS-T. IgYf de galinhas pré-ímmunes foram utilizadas como controle negativo. O peso molecular relativo das bandas proteicas reconhecidas foi determinado pela comparação com o marcador de peso molecular padrão (Real Biotech, RECOMTM Blue Wide Range Prestain Marker, Banqiao, Taiwan).

3.6 Aplicação das IgY para reconhecimento antigênico e diagnóstico sorológico

3.6.1 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados utilizando IgYi para identificar formas metacestódeas de *T. crassiceps*. Os metacestódeos foram embebidos em *Tissue-Tek*

(Sakura Finetek, Holanda) e congelados a -20 °C. Seções de 2 µm de espessura foram obtidas com o auxílio de um criomicrotomo (Leica CM 1850 UV, Alemanha) e os cortes foram aderidos em lâmina de microscopia. Após, o anticorpo IgYi anti-Tc diluído em PBS (50 µL) foi adicionado aos cortes histológicos na concentração de 90 µg e incubado em câmara úmida, a 37 °C, por 30 min. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário produzido em coelhos, anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, EUA) (1:100), diluído em azul de Evans 3% (Vetec, Brasil), por 30 min a 37 °C. Entre cada etapa da reação, os cortes histológicos foram lavados 3 vezes com PBS. A IgYi também foi avaliada por meio de ensaio utilizando cortes histológicos de metacestódeos de *T. solium*, nas mesmas condições. Como controle negativo, foi utilizado PBS (CARRARA *et al.*, 2020).

As lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH 9,0) e lamínulas e as imagens foram obtidas utilizando microscópio confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Alemanha).

3.6.2 Detecção de imunocomplexos circulantes em soros humanos

3.6.2.1 Amostras de soros

As amostras de soros humanos que foram utilizadas estavam disponíveis e armazenadas no Banco de Amostras Biológicas do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz. A manutenção destes espécimes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos/UFU (CEP/UFU) sob o protocolo de Nº 041/2008. A utilização dessas amostras para validação dos anticorpos IgY anti-Tc como ferramenta diagnóstica para a neurocisticercose foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas com seres humanos/UFU (CEP/UFU; CAAE: 65800116.4.0000.5152).

3.6.2.2 Grupo I: amostras de soro de pacientes com diagnóstico definitivo para neurocisticercose

Amostras de soro (n = 30) de pacientes com diagnóstico definitivo de NCC, de acordo com os critérios propostos por Del Brutto (2012a), foram utilizadas, sendo considerado como diagnóstico definitivo para NCC a presença de um critério absoluto ou presença de dois critérios principais, um critério secundário e um epidemiológico. O grupo 1 foi dividido em NCC ativa (n = 16), na qual os metacestódeos encontravam-se viáveis ou em degeneração precoce (estágio

vesicular, coloidal ou granular nodular); e NCC inativa (n = 14), na qual os metacéstódeos encontravam-se completamente degenerados (estágio granular calcificado) (SOTELO; GUERRERO; RUBIO, 1985). Pacientes com a forma mista da doença foram classificados como portadores de NCC ativa.

3.6.2.3 Grupo II: amostras de soros de pacientes com outras infecções parasitárias

Foram utilizadas amostras de soro (n = 30) de pacientes mono ou poliparasitados, incluindo *Ascaris* sp. (n = 2), *Echinococcus granulosus* (n = 4), *Entamoeba histolytica/dispar* (n = 1), *Enterobius vermicularis* (n = 3), *Giardia lamblia* (n = 2), Ancilostomatídeos (n = 3), *Hymenolepis nana* (n = 3), *Schistosoma mansoni* (n = 3), *Strongyloides stercoralis* (n = 2), *Taenia* sp. (n = 3) e *Trichuris trichiura* (n = 1), Ancilostomatídeos + *Ascaris* sp. (n = 1), Ancilostomatídeos + *Ascaris* sp. + *T. trichiura* (n = 1) e *H. nana* + *E. vermicularis* (n = 1) com o objetivo de verificar a reatividade cruzada no ensaio imunológico utilizado.

Todas as amostras de soro foram obtidas de indivíduos após exame parasitológico de fezes positivos, realizado com pelo menos três amostras fecais pelos métodos de HPJ (HOFFMANN; PONS; JANER, 1934) e/ou Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917; MORAES 1948). Os indivíduos foram considerados positivos para *Echinococcus granulosus* após diagnóstico positivo por ultrassonografia, tomografia computadorizada e sorologia e confirmação pelo exame parasitológico de fluido cístico após a cirurgia. Todos os casos foram submetidos a cirurgia para doença hidática.

3.6.2.4 Grupo III: amostras de soros de indivíduos saudáveis

Amostras de soro (n = 30) de voluntários aparentemente saudáveis, de acordo com sua apresentação clínica e exames imunológicos, foram utilizadas. Os indivíduos deste grupo tiveram três amostras fecais testadas negativamente pelos métodos parasitológicos descritos. Além disso, embora fossem provenientes de área endêmica de cisticercose, não apresentaram evidências de contato domiciliar com infecção por *T. solium* ou histórico de teníase ou cisticercose.

3.6.3 ELISA para detecção de imunocomplexos

A aplicação diagnóstica da IgYi anti-Tc foi verificada por meio do imunoenensaio ELISA, que avaliou o potencial do anticorpo na detecção de imunocomplexos circulantes em soros de pacientes com NCC. Inicialmente, microplacas de poliestireno, 96 poços, de alta afinidade (Santa Cruz Biotechnology, EUA) foram adsorvidas com 10 µg do *pool* de IgYi anti-Tc (50 µL/poço), diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6), e incubadas *overnight* a 4 °C. Após incubação, amostras de soros humanos (grupos 1, 2 e 3) foram diluídas (1:200) em PBS-T, adicionadas em duplicata e incubadas por 45 min a 37 °C. Em seguida, o anticorpo secundário produzido em cabras, anti-IgG humana, Fc específico, conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído (1:2.000) em PBS- T-M 1%, foi adicionado e incubado (45 min, 37 °C). O desenvolvimento da reação procedeu por 15 min a TA e as etapas de revelação e interrupção da reação foram realizadas de acordo com o item 3.5.2. Entre cada etapa da reação, os poços foram lavados três vezes com PBS-T. Os valores de absorbância foram determinados em filtro de 490 nm em um leitor de microplacas (Biotek, EUA). O *cut-off* foi estabelecido pela curva *receiver operating characteristic* (ROC) e os dados foram expressos em Índice ELISA (IE), de acordo com a fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / \text{cut-off dos controles negativos}$ (indivíduos saudáveis e infectados com outras parasitoses). Valores de $IE > 1,0$ foram considerados positivos.

3.7 Phage display: Biopanning

Para a seleção de peptídeos recombinantes expressos em bacteriófagos, ligantes às moléculas de IgYi, duas estratégias de seleção positivas foram utilizadas, sendo uma para cada anticorpo IgY específico a *T. crassiceps*: estratégia 1 – IgY anti-Tc; estratégia 2 – IgY anti-fração detergente de *T. crassiceps*-dTc. O anticorpo IgY anti-dTc utilizado estava disponível e armazenado no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, sob responsabilidade da Profa. Dra. Julia Maria Costa Cruz. A produção, obtenção e caracterização da IgY anti-dTc foi realizada por Carrara *et al.* (2020). Para a eliminação de clones que expressavam peptídeos inespecíficos, o anticorpo IgYi de galinha imunizada com PBS (IgYc) foi utilizado para a seleção negativa dos clones em ambas as estratégias e nas mesmas condições. Para cada estratégia, foi utilizada a biblioteca de bacteriófagos filamentosos M13 composta por clones com peptídeos randômicos de 7 aa (Ph.D.-C7C, New England BioLabs, Inglaterra) flanqueados por dois resíduos de cisteína nas extremidades e fusionados na região

N-terminal da proteína III do capsídeo. A biblioteca utilizada apresenta $1,0 \times 10^{11}$ possíveis combinações de resíduos de aa.

3.7.1 Seleção negativa

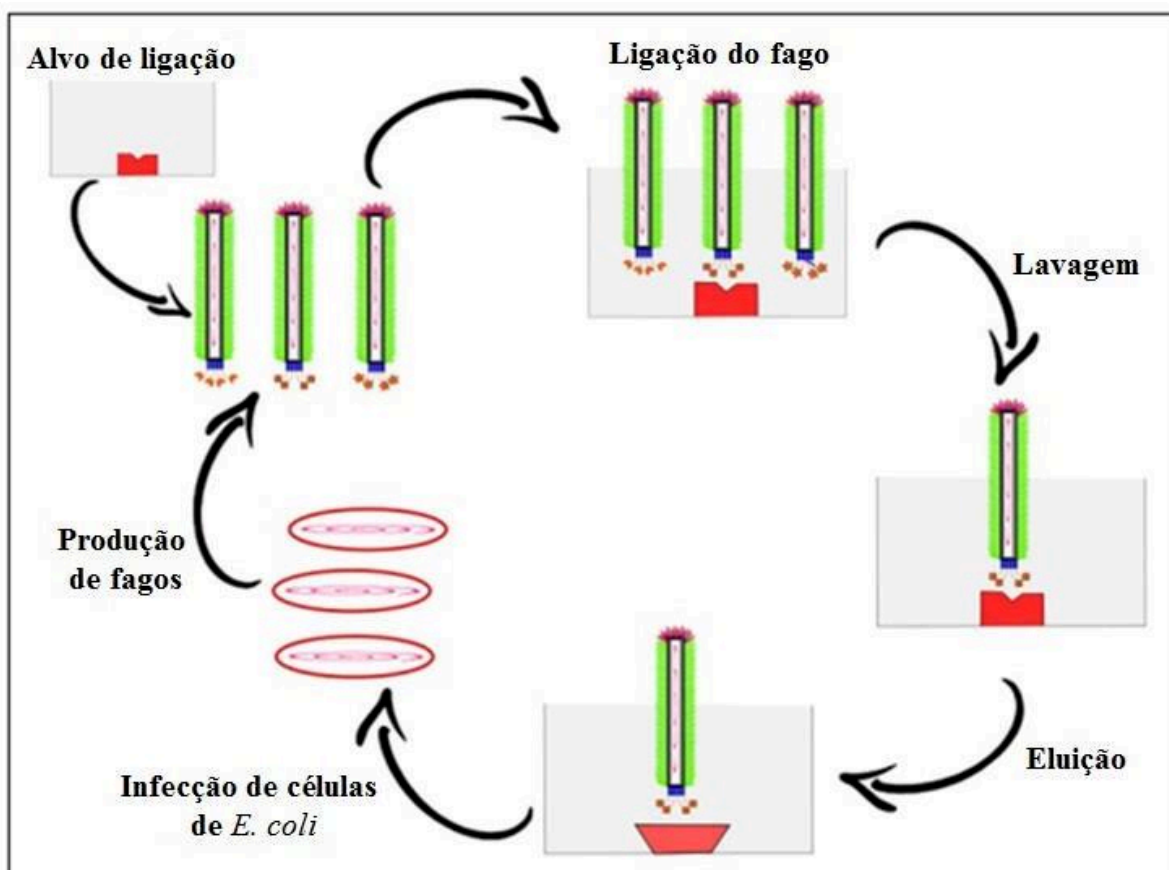
A primeira etapa de ciclos do *biopanning* foram realizados contra os anticorpos IgYc inespecíficos (seleção negativa). Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Maxi) foram adsorvidas com 150 μ L/poço de anticorpos IgYi (100 μ g/mL), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 8,6), e incubados *overnight* a 4 °C. Após adsorção dos anticorpos em seis poços (três poços para cada estratégia), foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos, que ocorreu pela adição de 300 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS 0,1 M, pH 7,4; BSA 5%), por 1 h a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados 2 vezes com 300 μ L/poço de PBS-T e secos com papel filtro para receber 10 μ L (1×10^{11}) da biblioteca randômica de fagos com os peptídeos expressos diluídos em 150 μ L de PBS, que foi adicionado no primeiro poço da seleção negativa (IgYc). Para evitar o ressecamento do restante dos poços durante as etapas de incubação, os que não continham a biblioteca de fagos foram preenchidos com 150 μ L de PBS. Após incubação por 30 min a 37 °C, o sobrenadante contendo os fagos não ligados foram transferidos para o segundo poço de seleção negativa (IgYc). O fim do primeiro ciclo de seleção negativa ocorreu após nova etapa de incubação como descrito anteriormente.

3.7.2 Seleção positiva

Na seleção positiva, os ciclos de *biopanning* foram realizados por meio da ligação com os anticorpos IgY específicos (anti-Tc e anti-dTc), sendo cada estratégia independente uma da outra. Inicialmente, o sobrenadante resultante da última etapa de seleção negativa foi adicionado nos primeiros poços contendo os anticorpos específicos IgY anti-Tc e anti-dTc, e foram incubados por 30 min a 37 °C. Após incubação, o sobrenadante foi transferido para os segundos poços da seleção positiva de cada estratégia e esse processo se repetiu nas duas estratégias até o terceiro poço contendo os anticorpos IgY específicos. Os sobrenadantes contendo fagos não ligantes foram descartados e cinco lavagens com PBS-T foram realizadas. Em seguida, a eluição dos clones de fagos ligantes aos anticorpos IgY nos três poços do alvo de cada estratégia foi realizada de forma competitiva com 100 μ g/mL (150 μ L/poço) de tampão de eluição (extrato antigênico total e fração detergente de *T. crassiceps* usados nas imunizações das galinhas) por 30 min a 37 °C. O fim do primeiro ciclo de seleção de fagos ocorreu com a

coleta dos volumes dos três poços alvo de cada estratégia. Uma pequena quantidade (1 μ L) do eluato final dos primeiros ciclos foi titulada e a parte restante foi amplificada. O esquema do *biopanning* pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Representação esquemática dos processos de seleção negativa e positiva por *biopanning* (ZAMBRANO-MILA; BLACIO; VISPO, 2019).



3.7.3 Amplificação dos clones

Para amplificação dos clones selecionados, 400 μ L do eluato de fagos foram adicionados em 20 mL de meio Luria Bertani – LB (Tryptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 5 g/L), contendo tetraciclina e uma colônia previamente isolada de *E. coli* (linhagem ER2738) em fase inicial de crescimento ($DO_{600} \sim 0,3$). Após incubação por cerca de 5 h a 37 °C, sob agitação, a cultura foi transferida para tubos estéreis e centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante foi transferido para novos tubos estéreis, onde se adicionou 1/6 do volume inicial do sobrenadante de PEG/NaCl (20% polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl), sendo a mistura incubada *overnight* a 4 °C. Posteriormente, centrifugou-se a mistura (10.000 rpm, 15 min, 4 °C), descartou-se o

sobrenadante e o *pellet* de fagos foi ressuscitado em 1 mL de PBS. A suspensão foi precipitada novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl, durante 1 h em gelo e, logo após, centrifugada (14.000 rpm, 10 min, 4 °C). Na sequência, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 200 µL de PBS. O eluato amplificado de clones de fagos do primeiro ciclo de seleção foi então titulado e utilizado em dois novos ciclos de seleção nas mesmas condições descritas. As titulações dos eluatos foram realizadas em cada ciclo de seleção.

3.7.4 Determinação do título dos fagos eluídos

Titulações foram realizadas para determinar a quantidade de partículas virais na entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*. Para todas as titulações, utilizou-se 1 µL do eluato diluído em 9 µL do meio de cultura LB (diluições seriadas de 10 vezes). As seguintes diluições foram empregadas: A) eluatos não amplificados, diluições de 10^1 a 10^4 ; B) eluatos após amplificação, diluições de 10^7 a 10^{10} . Todas as diluições foram incubadas com 200 µL de meio LB com *E. coli* ER2738 amplificadas na fase *mid-log* ($DO_{600} \sim 0,5$) por 5 min a TA. As soluções (bactéria + diluição) foram transferidas para tubos tipo Falcon contendo 3 mL de meio Agarose Top (210 mg de Agarose, 600 mg de LB, 30 mg $MgCl_2$) e plaqueadas em meio sólido, acrescido de IPTG (0,2 µL/mL), X-gal (2 µL/mL) e tetraciclina (1 µL/mL). Após incubação *overnight* a 37 °C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis multiplicado pelos fatores de diluição correspondentes) e os resultados expressos em UFC (unidade formadora de colônias).

3.7.5 Validação dos clones selecionados

As colônias isoladas dos fagos foram coletadas de uma placa de titulação proveniente do eluato do 3º ciclo de seleção do *biopanning* e transferidas para poços de placa de cultura (*deepwell*) para amplificação dos clones selecionados. Para a amplificação, foi utilizado 1,2 mL de cultura de *E. coli* (ER2738) em meio LB na fase *early-log* ($DO_{600} \sim 0,3$), sendo adicionada uma única colônia por poço. A placa foi vedada e, após incubação *overnight* a 37 °C, foi centrifugada a 3.700 rpm, por 50 min, a 4 °C para precipitação das bactérias e isolamento dos fagos. Os sobrenadantes de cada poço (800 µL) foram transferidos para outra placa *deepwell*, e, posteriormente, 50 µL de cada poço foram utilizados no ensaio de pré-validação.

3.7.6 Avaliação da imunorreatividade dos clones de fagos selecionados

Com o objetivo de identificar os clones de fagos mais relevantes em relação à sua especificidade, o teste ELISA foi realizado para a pré-validação de cada estratégia de seleção, no qual 96 clones oriundos da estratégia 1 (IgY anti-Tc) de *biopanning* e 96 clones da estratégia 2 (IgY anti-dTc) foram testados em duplicata. Para avaliar a reatividade de cada clone com a IgY alvo de cada seleção, microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar, Sigma-Aldrich, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos IgY isolados (anti-Tc e anti-dTc) nas mesmas condições do item 3.6.3. Após seis lavagens com PBS-T, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS-T-M 3% (50 µL/poço), por 1 h a 37 °C, e, em seguida, foi realizada mais uma lavagem com PBS-T. Na sequência, o sobrenadante de cada clone de fago amplificado (50 µL/poço) foi adicionado e incubado por 1 h a 37 °C. Um novo ciclo de lavagem com PBS-T foi realizado (6x, 200 µL/poço), e o anticorpo secundário anti-M13 conjugado com peroxidase, diluído (1:5.000) em PBS-T-M 5%, foi então adicionado. As etapas de incubação do conjugado, revelação e interrupção da reação seguiram as mesmas condições do item 3.5.2.

Os clones de fagos considerados mais reativos no ensaio anterior foram avaliados em um novo teste ELISA com *pool* de amostras de soros de pacientes aleatórios pertencentes aos três grupos (diagnóstico definitivo para NCC, outras infecções parasitárias e indivíduos saudáveis). Cinco clones da estratégia 1 (IgY anti-Tc), três da estratégia 2 (IgY anti-dTc) e o fago selvagem (controle negativo da reação) foram adsorvidos em microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar, Sigma-Aldrich, EUA), na concentração de 1×10^{11} UFC/poço diluídos em 50 µL de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Após um ciclo de lavagem com PBS-T, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS-T-M 5% (50 µL/poço) por 1 h a 37 °C. Em seguida, um novo ciclo de lavagem foi realizado (3x, PBS-T), as amostras de *pool* de soros diluídas (1:200) em PBS-T-M 5% (50 µL/poço) foram adicionadas e incubadas por 1 h a 37 °C. Os poços foram lavados seis vezes com PBS-T e o anticorpo secundário produzido em cabras, anti-IgG humana, Fc específico, conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído (1:2.000) em PBS-T-M 5%, foi adicionado e incubado (1 h, 37 °C). As etapas de revelação e interrupção da reação seguiram as mesmas condições do item 3.5.2.

3.7.7 Extração e sequenciamento de DNA

Para extração do DNA dos clones, os fagos considerados mais relevantes foram novamente amplificados e purificados como descrito no item 3.7.5. Em seguida, após a transferência dos sobrenadantes para nova placa *deep well*, foi adicionado aos poços 125 µL de PEG/NaCl e incubou-se por 10 min a 4 °C. Após incubação, uma centrifugação a 3.700 rpm, por 1h a 4 °C foi realizada para precipitação dos fagos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e 100 µL de tampão iodeto (10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4 M de NaI) foram adicionados aos precipitados. A placa foi agitada e a precipitação do ácido nucleico foi realizada pela adição de 250 µL de etanol absoluto, incubados por 10 min a TA, e centrifugados a 3.700 rpm, por 40 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados foram lavados com 150 µL de etanol a 70% e centrifugados novamente. O DNA precipitado foi então ressuspensão em 15 µL de água ultrapura, e a qualidade do DNA presente nas amostras foi avaliada por corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%.

O sequenciamento foi realizado segundo o protocolo da empresa Myleus Biotechnology (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Para a reação de sequenciamento, 100 ng de DNA molde e 10 pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - *Biolabs*) foram utilizados.

3.8 Análise dos dados do sequenciamento por Bioinformática

Para a tradução das sequências de nucleotídeos codificadoras dos peptídeos expressos na proteína III do capsídeo dos fagos selecionados foi utilizada a ferramenta *translate* do programa *ExpASy* (disponível em <http://web.expasy.org/translate/>). O programa *BLAST Basic Local Alignment Search Tool* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), por meio da ferramenta *Protein blast* (BLASTp), foi utilizado para comparar o grau de similaridade das sequências de aa identificadas dos peptídeos selecionados com as sequências de proteínas registradas de *T. crassiceps* em banco de dados. Os peptídeos identificados foram comparados quanto às homologias entre os mesmos pelo programa *Clustal Omega* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.9 Amplificação e purificação dos clones selecionados

Para a obtenção de volume necessário para a aplicação no ensaio imunoenzimático (*phage*-ELISA) com soros de pacientes com NCC, os clones de fagos considerados mais relevantes em especificidade foram amplificados. Inicialmente, foram adicionados 10 μ L de cada clone de fago considerado relevante em Erlenmeyer contendo 200 mL de cultura de *E. coli* ER2738 em fase *early-log* (DO 600 ~ 0,3) adicionado de tetraciclina. As culturas foram incubadas *overnight* a 37 °C, sob agitação (250 rpm) e, posteriormente, foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo e adicionado de PEG/NaCl (1/6 do volume) para precipitação dos clones. Após incubação *overnight* a 4 °C, em repouso, a solução foi centrifugada (15 min, 10.000 rpm, 4 °C), e, ao precipitado, foi adicionado 1 mL de PBS. A suspensão foi transferida para microtubo de 1,5 mL e centrifugada por 10 min a 14.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi então transferido para um novo microtubo, adicionado de PEG/NaCl (1/6 do volume), incubado 1 h no gelo e centrifugado por 10 min a 14.000 rpm, 4 °C. Ao final, foi adicionado ao precipitado 500 μ L de PBS, e os fagos foram então quantificados em espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation, EUA) nas absorvâncias de 269 e 320 nm e o resultado calculado pela seguinte fórmula: Fago/ μ L = (Absorvância 269 nm – Absorvância 320 nm) x 6 x 10¹¹/0,7222. As suspensões quantificadas foram estocadas a 4 °C, até o momento de sua utilização.

3.10 Aplicação dos clones de fagos selecionados no imunodiagnóstico da neurocisticercose por *phage*-ELISA

Foram obtidos 3 clones de fagos considerados relevantes (específicos) e com sequências de aminoácidos válidas, sendo um resultante da estratégia 1 e dois da estratégia 2. Esses clones foram avaliados quanto a aplicação no diagnóstico sorológico de pacientes com NCC por meio do teste *phage*-ELISA. Amostras de soros de pacientes com NCC (n = 30), com outras infecções parasitárias (n = 30) e de indivíduos saudáveis (n = 30) foram testadas. Dentre os pacientes com outras infecções parasitárias, amostras de soro de pacientes mono ou poliparasitados, incluindo *Ascaris* sp. (n = 2), *E. granulosus* (n = 5), *E. vermicularis* (n = 3), Ancilostomatídeos (n = 5), *H. nana* (n = 2), *S. mansoni* (n = 6), *S. stercoralis* (n = 6), *Taenia* sp. (n = 1) foram utilizadas.

Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar, Sigma-Aldrich, EUA) foram previamente adsorvidas com cada clone selecionado e com um clone inespecífico (fago M13, selvagem) (1 x 10¹¹UFC/poço), diluídos em 50 μ L de tampão carbonato-bicarbonato (pH

9,6). Após lavagem com PBS-T, os poços foram bloqueados com 50 µL de PBS-T-M 5% por 1 h a 37 °C. Em seguida, três novas lavagens com PBS-T foram realizadas; as amostras de soro anteriormente descritas foram diluídas (1:200) em PBS-T-M 5%, adicionadas e incubadas por 1 h a 37 °C. Após incubação, os poços foram lavados seis vezes com PBS-T e, na sequência, o anticorpo secundário produzido em cabras, anti-IgG humana, Fc específico, conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído (1:2.000) em PBS-T-M 5%, foi adicionado e incubado (1 h, 37 °C). As etapas de revelação e interrupção da reação seguiram as mesmas condições do item 3.5.2. O resultado final foi ajustado subtraindo a DO média de três clones de fago M13 (selvagem) das leituras de DO dos clones de fagos específicos. Os valores de *cut-off* foram estabelecidos utilizando a DO média de três amostras não reativas mais dois desvios padrão. Os dados foram expressos em IE, de acordo com a fórmula: $IE = \text{DO da amostra} / \text{cut-off dos controles negativos}$ (DO média de três amostras não reativas mais dois desvios padrão). Valores de $IE > 1,0$ foram considerados positivos.

3.11 Normas de biossegurança

Todo o procedimento de coleta e manuseio das amostras de soro e reagentes, bem como a utilização dos equipamentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança descritas por Mineo (2009).

3.12 Análise estatística

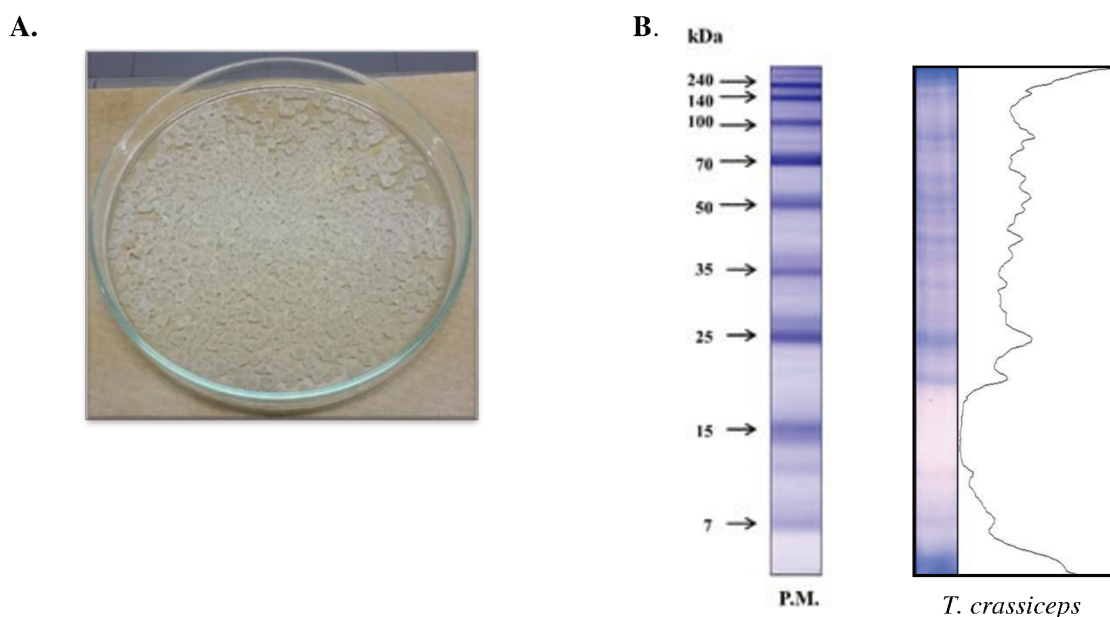
Os valores de *cut-off* para o teste ELISA para detecção de imunocomplexos foi estabelecido utilizando a curva *receiver operating characteristic* (ROC). Valores diagnósticos de sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (ASC) também foram obtidos pela curva ROC. Razão de probabilidade positiva e negativa (RP+/RP-) foram calculadas (SOPELETE, 2009). O teste *one-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey foram utilizados para analisar diferenças entre os grupos na detecção de imunocomplexos. As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa computacional *GraphPad Prism* versão 6.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da preparação antigênica de *T. crassiceps*

A preparação do extrato salino total de metacestódeos *T. crassiceps* foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), sem evidências de degradação (Figura 5, A e B). O extrato antigênico foi mensurado e apresentou concentração proteica de 12.000 µg/mL. Após os processos de caracterização e de determinação da concentração proteica, o antígeno foi utilizado no protocolo de imunização das galinhas.

Figura 5. (A) Formas metacestódeas de *Taenia crassiceps* utilizadas na preparação antigênica; (B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% do extrato salino total de *T. crassiceps* utilizado nas imunizações das galinhas. Padrão de peso molecular (P.M.). kDa: kiloDalton.



4.2 Imunizações das galinhas, obtenção dos ovos e produção dos anticorpos fracionados

As galinhas imunizadas com extrato salino total de *T. crassiceps* (grupo I) e com PBS (grupo II) foram monitoradas diariamente, não sendo evidenciados processos inflamatórios locais devido às imunizações. A experimentação animal foi realizada durante 9 semanas (63 dias), sendo iniciada uma semana antes da primeira imunização (semana 0, pré-imune). As gemas obtidas provenientes dos ovos coletados diariamente foram reunidas para formar um

pool semanal, utilizado posteriormente na produção dos anticorpos fracionados. Amostras de sangue foram coletadas semanalmente.

As etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY provenientes das gemas dos ovos das galinhas estão esquematizadas na figura 6. Na primeira etapa, foi realizada a retirada da fração lipídica das gemas (delipidação), sendo o precipitado (P1) descartado e o sobrenadante rico em proteínas (S1) que se formou, precipitado com sulfato de amônio na segunda etapa. Desta forma, um *pellet* (P2) rico em anticorpos IgY foi obtido e o sobrenadante (S2) desta segunda etapa foi descartado. O rendimento médio de anticorpos IgY ao fim do fracionamento foi de 4.903,8 $\mu\text{g/mL}$ (semana 0, pré-imune) a 6.100,8 $\mu\text{g/mL}$ (oitava semana), como demonstrado na Tabela 1.

Figura 6. Etapas do processo de fracionamento dos anticorpos IgY provenientes das gemas dos ovos das galinhas.

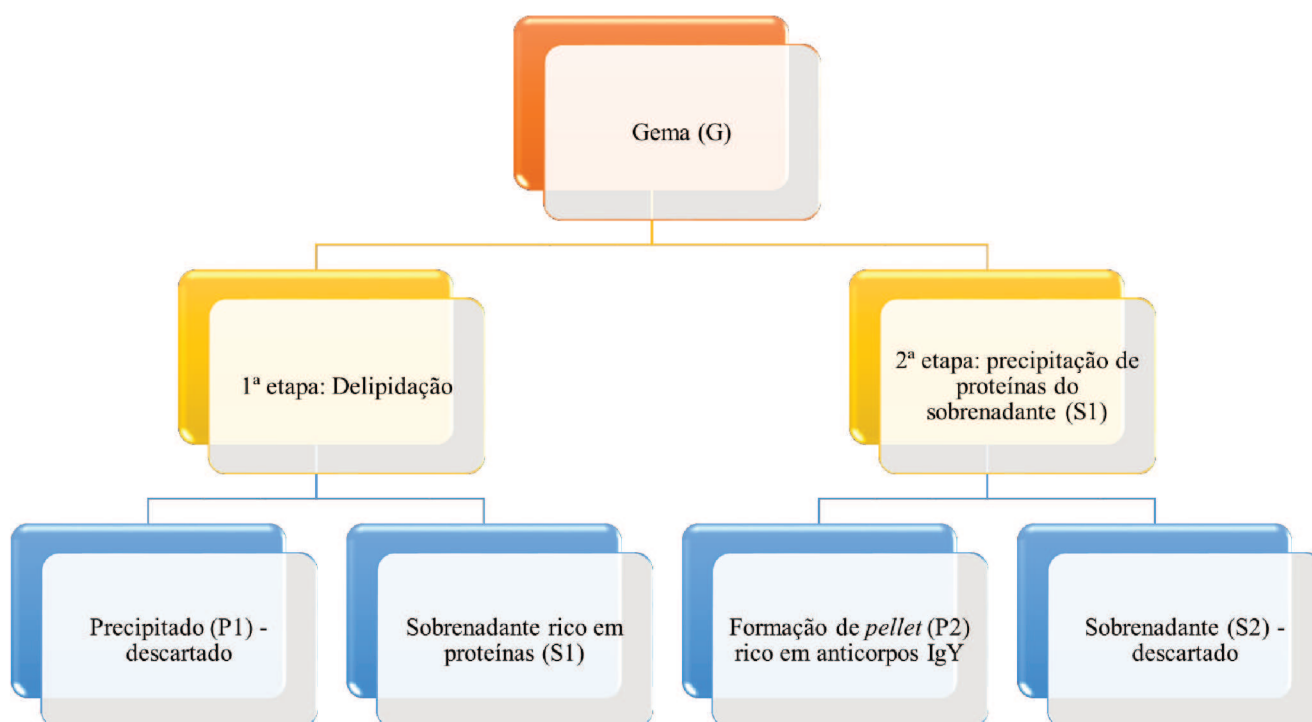


Tabela 1. Concentração dos anticorpos IgY fracionados a partir do *pool* semanal das gemas dos ovos

Semanas	Período (dias)	Concentração IgY ($\mu\text{g/ml}$)
0	1-7	4.903,8
1	8-14	3.662,8
2	15-21	4.352,0
3	22-28	4.258,6
4	29-35	4.068,2
5	36-42	5.989,4
6	43-49	6.214,4
7	50-56	5.604,2
8	57-63	6.100,8

4.3 Isolamento dos anticorpos IgY anti-Tc

Os anticorpos IgY anti-Tc (sexta e oitava semanas) obtidos após o fracionamento foram isolados por cromatografia de interação tiofílica em sistema completo ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare, EUA). Após a etapa de concentração em sistema de ultrafiltração, 1 mL dos anticorpos fracionados foi aplicado em cada corrida cromatográfica, resultando em 15 tubos (1 mL/tubo) contendo os anticorpos IgY isolados (Figura 7). Os anticorpos foram novamente concentrados após o isolamento, as IgY isoladas das duas semanas (6^a e 8^a semanas) foram reunidas para formar um *pool* e, posteriormente, a dosagem do *pool* foi realizada, resultando em 1812,4 $\mu\text{g/mL}$.

A confirmação da presença de IgY isolada (IgYi) foi realizada por meio de ensaios de *dot-blot*, o qual permitiu a visualização da presença dessas moléculas (Figura 8).

Figura 7. Cromatograma obtido do isolamento das imunoglobulinas Y anti-Tc (6^a e 8^a semanas). O pico número 1 corresponde a eluição dos anticorpos aderidos na coluna cromatográfica (tubos 35-50) e o segundo pico (2) corresponde à ovoalbumina, que foi descartada.

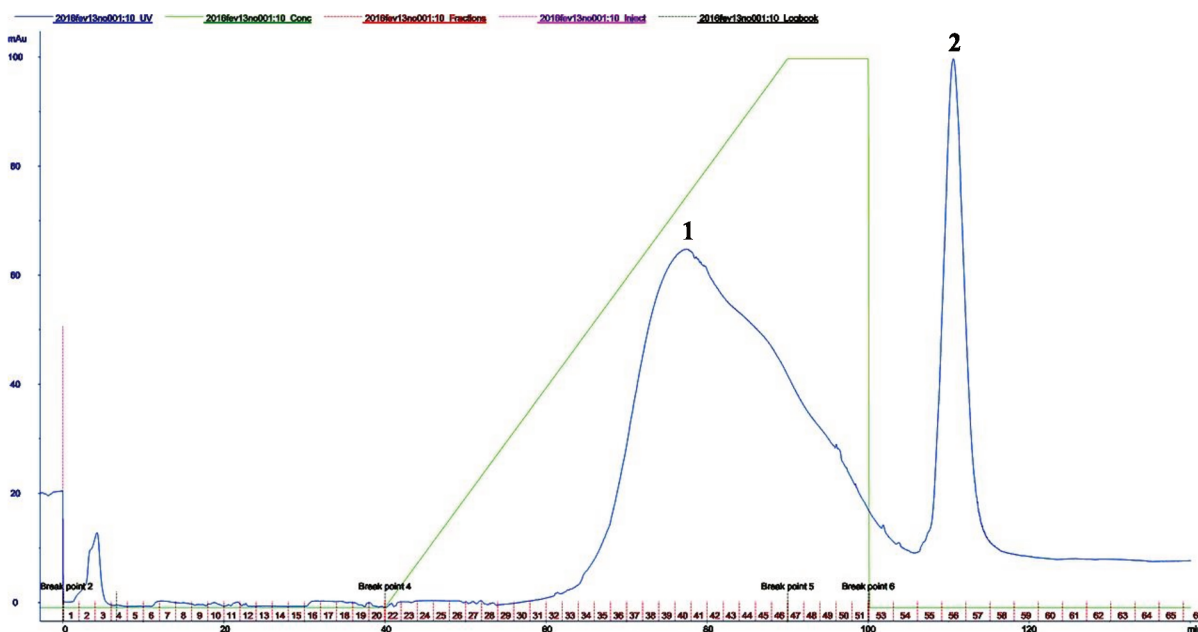
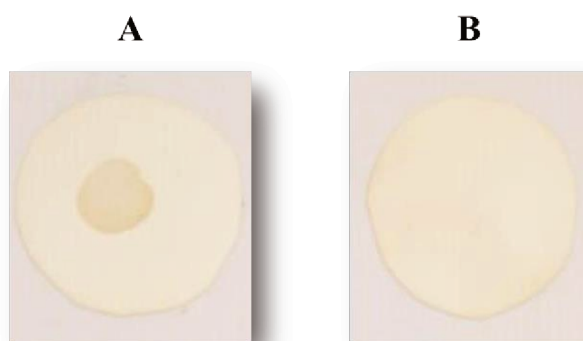


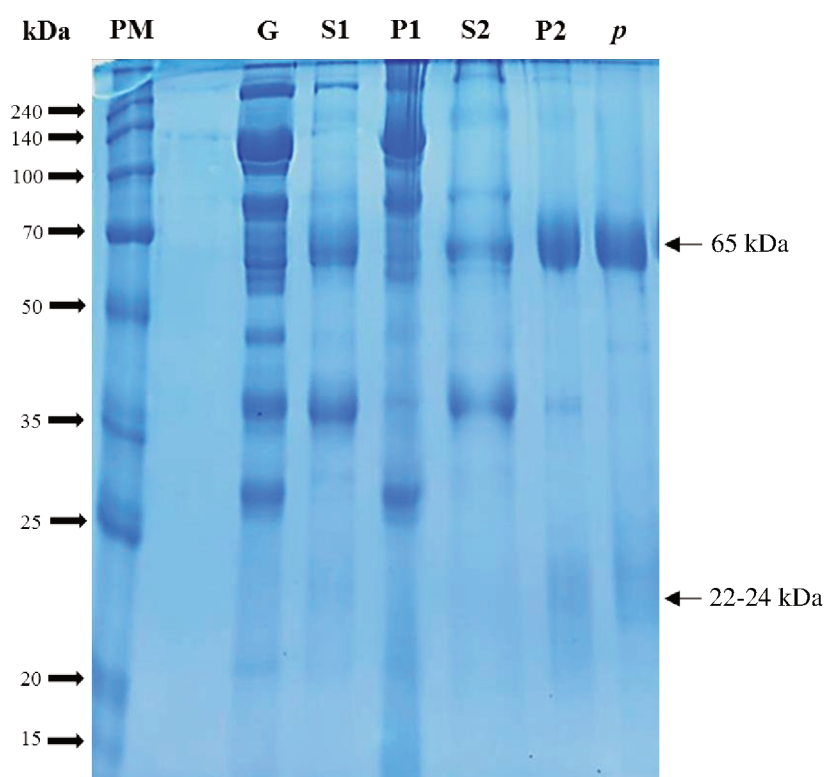
Figura 8. Ensaio *dot blot* para confirmação da presença de IgY anti-Tc após processo de isolamento. (A) IgY anti-Tc isolada; (B) Controle negativo: Soroalbumina bovina (BSA 1%).



Os anticorpos IgYi foram avaliados quanto à sua integridade por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) sob condições redutoras. Alíquotas de cada etapa do processo de fracionamento (G, S1, P1, S2, P2) foram avaliadas nas mesmas condições. A comprovação da presença das cadeias pesadas (65 kDa) e leves (22-24 kDa) observadas principalmente em P2 e na IgYi ocorreu por meio do tratamento das amostras com 2-

mercaptoetanol 5%, que ocasionou a quebra das pontes de dissulfeto entre as cadeias leves e pesadas dessas moléculas (Figura 9).

Figura 9. Eletroforese em SDS-PAGE 12%, sob condições redutoras, das etapas do processo de fracionamento e isolamento das IgY anti-Tc. **G** – Solução de gema; **S1** – sobrenadante proteico; **P1** – precipitado lipídico; **S2** – sobrenadante descartado pós- precipitação proteica; **P2** – precipitado rico em IgY pós-precipitação; **p** – pool de anticorpos isolados da sexta e oitava semana. **PM**: Padrão de peso molecular; **kDa**: kiloDalton; coloração por *Coomassie Brilliant Blue*.



4.4 Caracterização dos anticorpos IgY anti-Tc

4.4.1 ELISA indireto

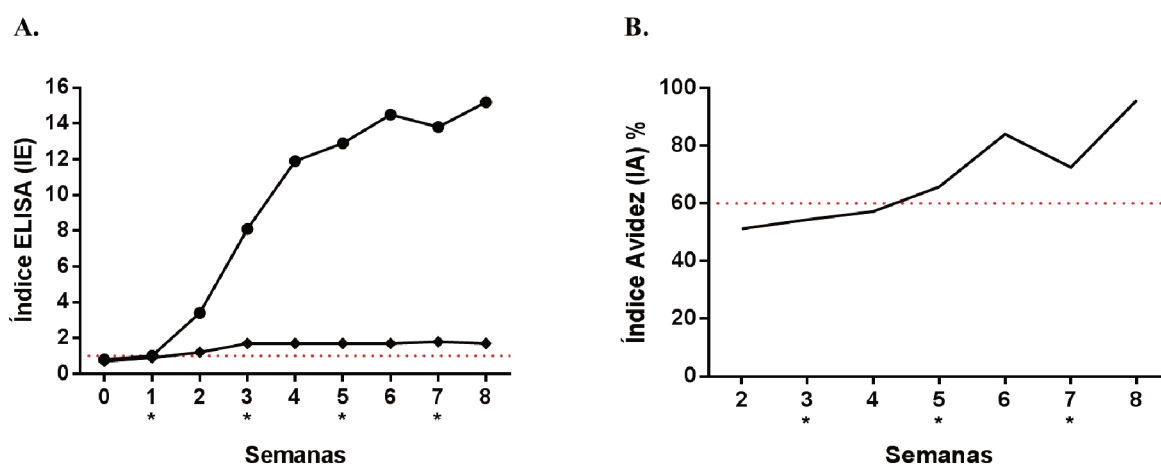
As amostras (IgYf) provenientes das gemas e amostras de soros obtidas semanalmente foram utilizadas no ensaio imunoenzimático ELISA para avaliação da cinética de produção dos anticorpos IgY e de sua especificidade a *T. crassiceps*. A reatividade dos anticorpos IgYf específicos ao antígeno foi observada a partir da primeira semana (segunda semana de experimentação) após a primeira imunização. Após a segunda imunização, um aumento gradual

da conversão de anticorpos IgY ocorreu até a sexta semana, alcançando valores de IE > 10 a partir da quarta semana. A soroconversão também foi observada a partir da semana 1 após a primeira imunização (IE > 1,0), com constante produção a partir da semana 4 (Figura 10, A).

4.4.2 ELISA avidéz

A avidéz dos anticorpos IgY obtidos do processo de fracionamento foi avaliada pelo teste ELISA indireto. Nesse ensaio, foram utilizadas imunoglobulinas provenientes das gemas das semanas que apresentaram IE > 1,0. Altos índices de avidéz foram observados após o tratamento dos complexos antígeno-anticorpo com ureia 6 M a partir da semana 5, variando de 65,8% a 95,8%, com índices maiores nas semanas 6 (84,0%) e 8 (95,8%) (Figura 10, B).

Figura 10. (A) Cinética de produção dos anticorpos IgY anti-Tc obtidos das gemas dos ovos (•) e dos soros (♦) das galinhas. A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1); semana 0 = Pré-imunização; * = imunizações. Ensaio de avidéz (B) dos anticorpos IgY anti-Tc fracionados obtidos das gemas dos ovos, tratados com ureia 6 M. Índice de avidéz foi considerado alto quando AI > 60%; * = imunizações.



4.4.3 Reconhecimento antigênico por *immunoblotting* e identificação do tecido parasitário por imunofluorescência indireta

O padrão de reconhecimento de bandas polipeptídicas de Tc, utilizando *pool* de IgYi, foi obtido por *immunoblotting*, como demonstrado na figura 11. Foram reconhecidas bandas de polipetídeos imunodominantes nas regiões de 24, 27, 38, 43, 45, 59, 70, 100, 140 e 215 kDa.

Nenhuma banda proteica foi reconhecida quando utilizada IgY da semana pré-imune.

Para confirmar o potencial dos anticorpos IgYi em reconhecer cortes histológicos de metacestódeos de *T. solium* e *T. crassiceps*, ensaios de imunofluorescência indireta foram realizados. Uma alta imunorreatividade evidenciada pela intensa fluorescência foi observada em ambos os cortes, confirmando o compartilhamento de epítomos entre essas espécies (Figura 12).

Figura 11. Aplicação de anticorpos IgYi anti-Tc na detecção de polipeptídeos antigênicos do extrato total de *T. crassiceps* por *Immunoblotting*. **(A)** pool de IgYi; **(B)** semana pré- imune. P.M.: Padrão de peso molecular; kDa: kiloDalton.

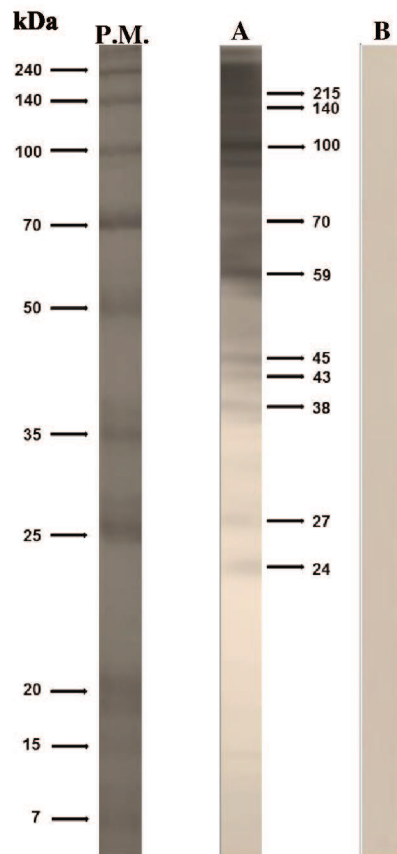
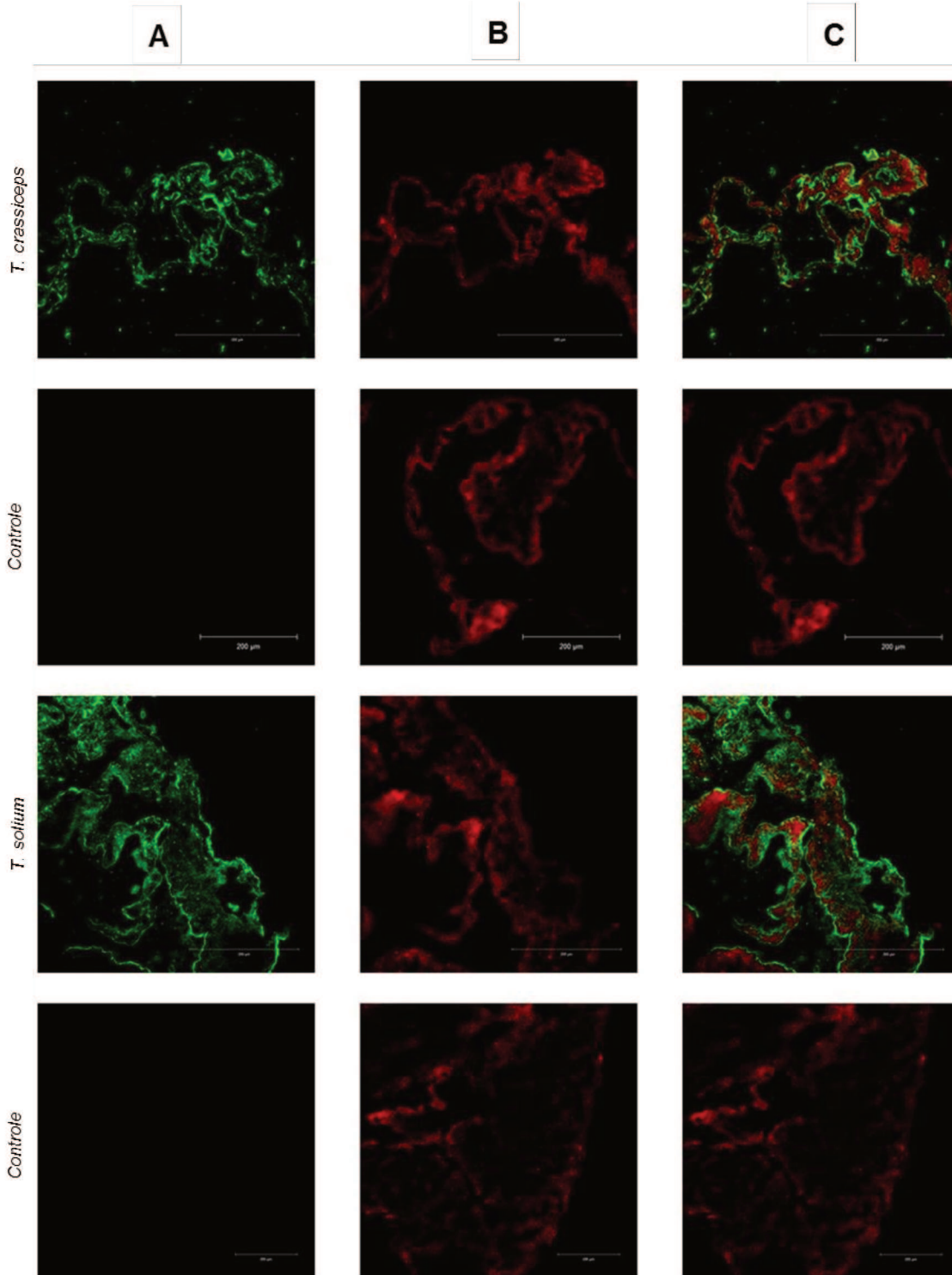


Figura 12. Imunofluorescência indireta em cortes histológicos de metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium* utilizando IgYi anti-Tc. (A): anti-IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC); (B): Contracoloração com azul de Evans; (C): das colunas A com a B.



4.5 Aplicação dos anticorpos IgYi anti-Tc

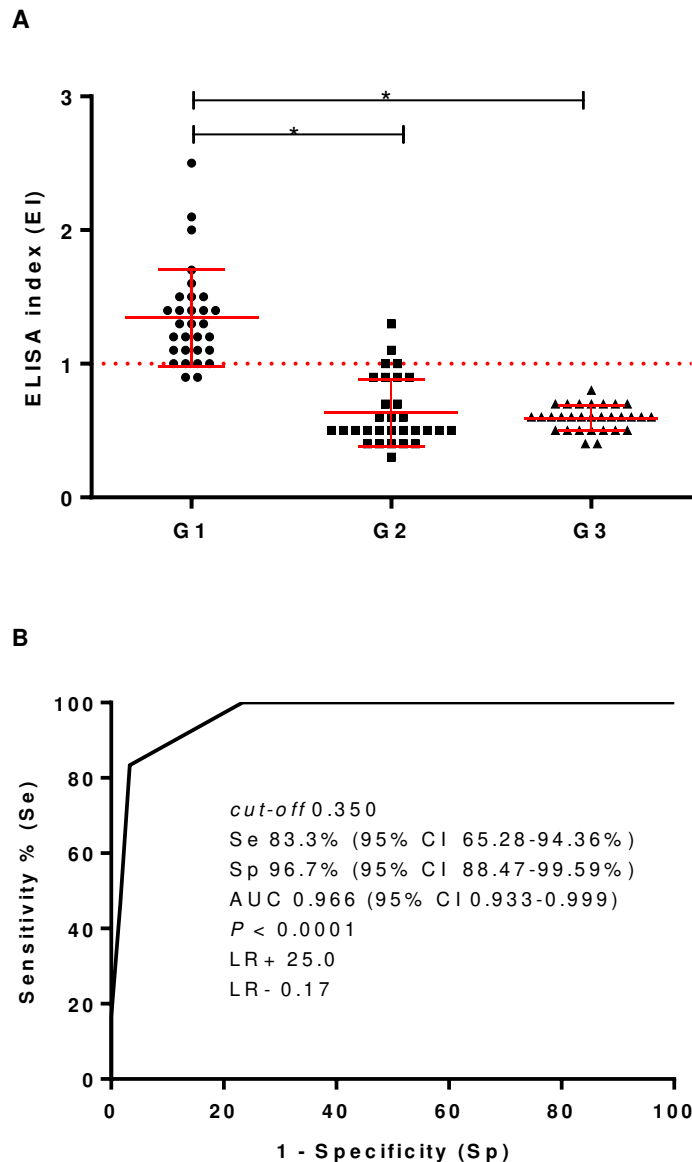
4.5.1 Detecção de imunocomplexos por ELISA

Imunocomplexos circulantes no soro, formados por anticorpos IgG e antígenos parasitários, foram reconhecidos por anticorpos IgYi no imunodiagnóstico da NCC pelo teste ELISA (Figura 13, A). Amostras de soro de pacientes com NCC (grupo I), outras infecções parasitárias (grupo II) e de indivíduos saudáveis (grupo III) foram testadas, e os resultados de positividade obtidos foram, respectivamente: 80% (24/30), 6,7% (2/30) e 0% (0/30). A reatividade cruzada foi observada quando utilizada amostras de pacientes infectados com *E. granulosus*.

De acordo com o critério de corte estabelecido pela curva ROC para o ensaio, valores de Se e Es obtidos foram de 83,3% e 96,7%, respectivamente. A RP+ foi calculada e o resultado (RP+ = 25,0) indicou grande e conclusivo aumento na probabilidade que a NCC exista nos casos positivos; valor de RP- (RP- = 0,17) indicou moderado decréscimo na probabilidade da doença em casos negativos. O valor de ASC estabelecido pela curva ROC foi de 0,966 (Figura 13, B).

As análises por *one-way* ANOVA mostraram diferenças significantes entre os três grupos analisados ($F = 79,04$; $P < 0,0001$). O pós-teste de múltiplas comparações de Tukey apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação dos valores de IE do grupo I ($m = 1,343$) com o grupo II ($m = 0,633$) (diferença média = 0,710; 0,460- 0,960, 99,9% IC) e valores de IE do grupo I com o grupo III ($m = 0,593$) (diferença média = 0,750; 0,500-1,000, 99,9% IC) ($P < 0,001$). Os grupos II e III não apresentaram diferença estatisticamente significativa (diferença média = 0,040; -0,210-0,290, 99,9% IC).

Figura 13. (A) Detecção de imunocomplexos por ELISA em amostras de soro de pacientes com neurocisticercose confirmada (GI; n = 30); pacientes com outras infecções parasitárias (GII; n = 30) e indivíduos saudáveis (GIII; n = 30). A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1); as barras horizontais indicam a média e as verticais os desvios padrões; *: one-way ANOVA, com pós teste de Tukey ($p < 0,0001$). (B) *Receiver operating characteristic curves* (curva ROC) indicando no ponto de *cut-off*, sensibilidade (Se), especificidade (Es) e área sob a curva (ASC). Razões de probabilidades (RP+ e RP-) foram calculados.



4.6 Seleção de fagos ligantes às moléculas de IgY

Após três ciclos de seleção negativa, realizados para a eliminação dos clones que se ligassem à anticorpos inespecíficos; e três de seleção positiva, nos quais os clones de fagos com peptídeos ligantes das moléculas de IgY específicas foram eluídos e amplificados, foram identificados dois clones de cada estratégia de *biopanning*. A identificação foi realizada pelo teste ELISA, que permitiu a avaliação dos clones mais relevantes (específicos), e posteriormente pelo sequenciamento de DNA dos fagos.

Para obter clones de fagos com maior especificidade, um aumento na pressão de seleção foi realizado por meio do aumento na quantidade de lavagens do 1º para o 2º e 3º ciclos de seleção. A titulação dos clones de fagos foi obtida pela contagem de colônias azuis (Figura 14), que representam a infecção das bactérias *E. coli* (ER2738) com os fagos M13 carregando o gene da β -galactosidase, demonstrando a quebra do substrato X-gal e a expressão do gene da β -galactosidase pelo fago. Os títulos de entrada (fagos amplificados) e de saída (fagos não amplificados) estão representados na Tabela 2. A ligação dos peptídeos dos clones de fagos aos anticorpos IgY inespecíficos na seleção negativa ou sua remoção durante as etapas de lavagem resultaram em maiores títulos de entrada do que de saída em ambas as estratégias utilizadas nos ciclos de *biopanning*.

Figura 14. Titulação dos clones de fagos obtida pela contagem de colônias azuis para a obtenção dos títulos de entrada e saída dos ciclos de seleção. O número de colônias azuis foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente. Os resultados foram expressos em UFC (unidade formadora de colônias).

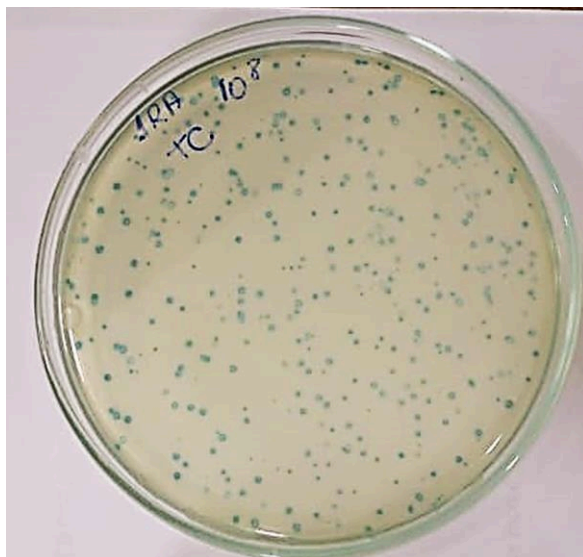


Tabela 2. Títulos obtidos nos ciclos de seleção das estratégias 1 (IgY anti-Tc) e 2 (IgY anti-dTc) por *biopanning*. UFC: unidade formadora de colônias.

Estratégia/ Ciclos de seleção	Número de partículas de fagos (UFC)		
	Entrada		Saída
IgY anti-Tc			
1°	Biblioteca Original	1×10^{11}	5×10^4
2°	Fagos do 1° ciclo	1×10^{11}	1×10^4
3°	Fagos do 2° ciclo	1×10^{11}	1×10^4
IgY anti-dTc			
1°	Biblioteca Original	1×10^{11}	$4,7 \times 10^4$
2°	Fagos do 1° ciclo	1×10^{11}	1×10^4
3°	Fagos do 2° ciclo	1×10^{11}	$1,8 \times 10^4$

Para identificação dos clones de fagos mais relevantes em relação à sua especificidade aos alvos de seleção, 96 clones oriundos da estratégia 1 (IgY anti-Tc) e 96 clones da estratégia 2 (IgY anti-dTc) de *biopanning* foram testados por phage-ELISA. No total, quatro ensaios foram realizados, nos quais os clones foram selecionados de acordo com os maiores valores de absorvância. No primeiro ensaio, realizado com sobrenadante de cada clone de fago amplificado, foram selecionados 9 clones (B6, C6, C11, C12, D3, D4, D7, D8 e D12) da estratégia 1 (IgY anti-Tc) e 3 (B1, C7 e E12) da estratégia 2 (IgY anti-dTc) (Figura 15, A e B); no segundo, realizado com clones de fagos purificados obtidos no primeiro ensaio, um novo *screening* foi realizado, resultando em 4 clones (C11, C12, D3, D7 e D8) da estratégia 1 (IgY anti-Tc) e 3 (B1, C7 e E12) da estratégia 2 (IgY anti-dTc) (Figura 16, A e B).

Um terceiro ensaio foi realizado para avaliação dos clones selecionados quando empregados no reconhecimento de anticorpos IgG em *pool* de amostras de soro de pacientes com NCC confirmada ($n = 7$), com outras infecções parasitárias ($n = 42$) e de indivíduos saudáveis ($n = 14$). Os valores de absorvância resultantes dos 3 *pools* utilizados foram subtraídos com os valores obtidos quando utilizado um clone de fago inespecífico (selvagem), testado nas mesmas condições, o que comprovou a especificidade dos clones de fagos selecionados nas duas estratégias de *biopanning* (IgY anti-Tc e IgY anti-dTc). Uma maior reatividade foi observada pelos clones da estratégia 1 com o *pool* de amostras de soro de pacientes com NCC confirmada (Figura 17, A e B).

Figura 15. Phage-ELISA para análise da reatividade dos clones de fagos obtidos após os ciclos de *biopanning*. **(A)** Clones de fagos obtidos da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); **(B)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior reatividade. Colunas marsala e laranja representam a reatividade dos clones à IgY anti-Tc e anti-dTc, respectivamente **(A, B)**. Colunas cinza representam reatividade dos clones à IgY controle **(A, B)**. DO – Densidade óptica a 492 nm.

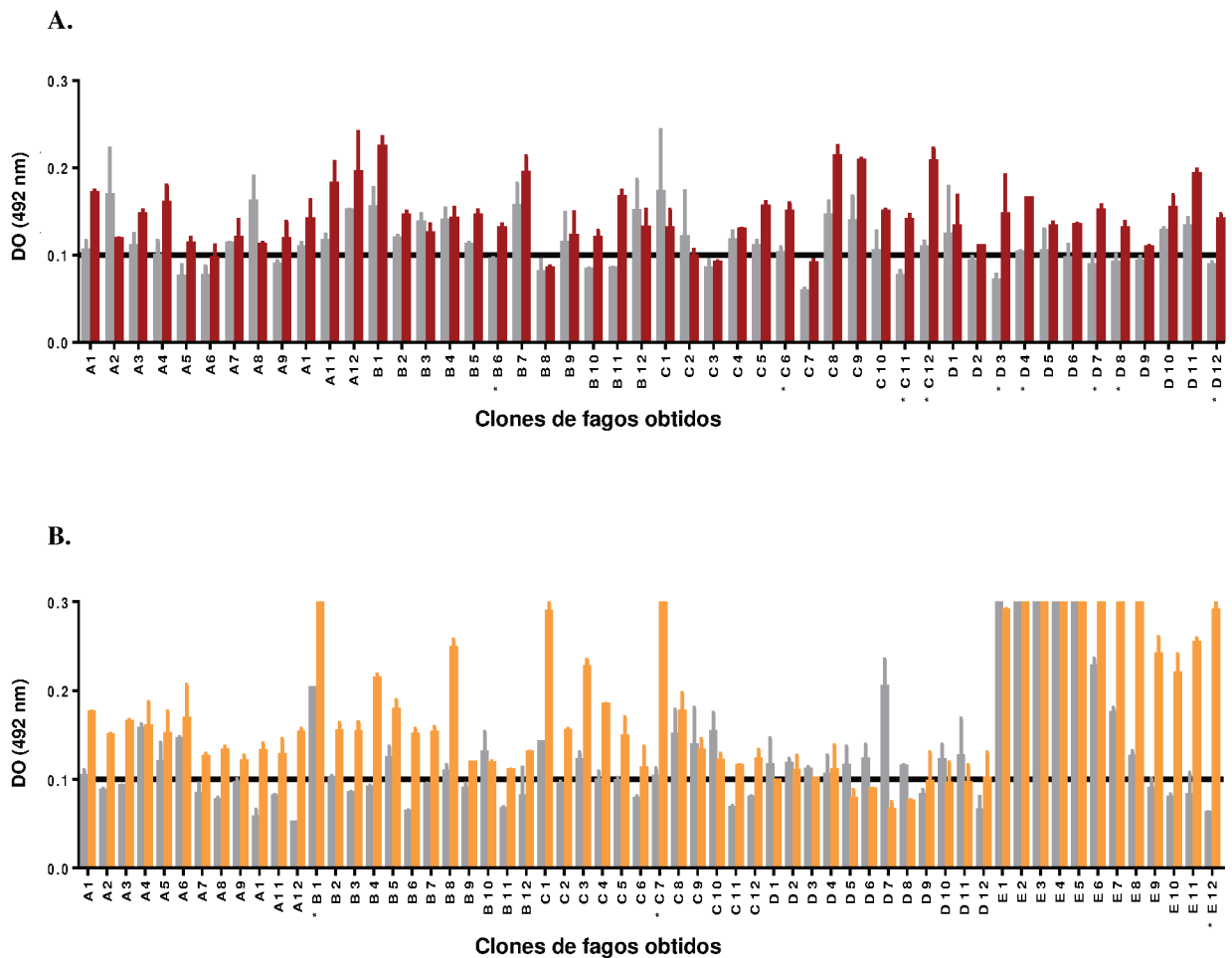


Figura 16. Phage-ELISA para *screening* dos clones de fagos purificados. **(A)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); **(B)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior especificidade aos anticorpos IgY anti-Tc e anti-dTc. Colunas marsala e laranja representam a reatividade dos clones à IgY anti-Tc e anti-dTc, respectivamente **(A, B)**. Colunas cinza representam reatividade dos clones à IgY controle **(A, B)**. DO – Densidade óptica a 492 nm.

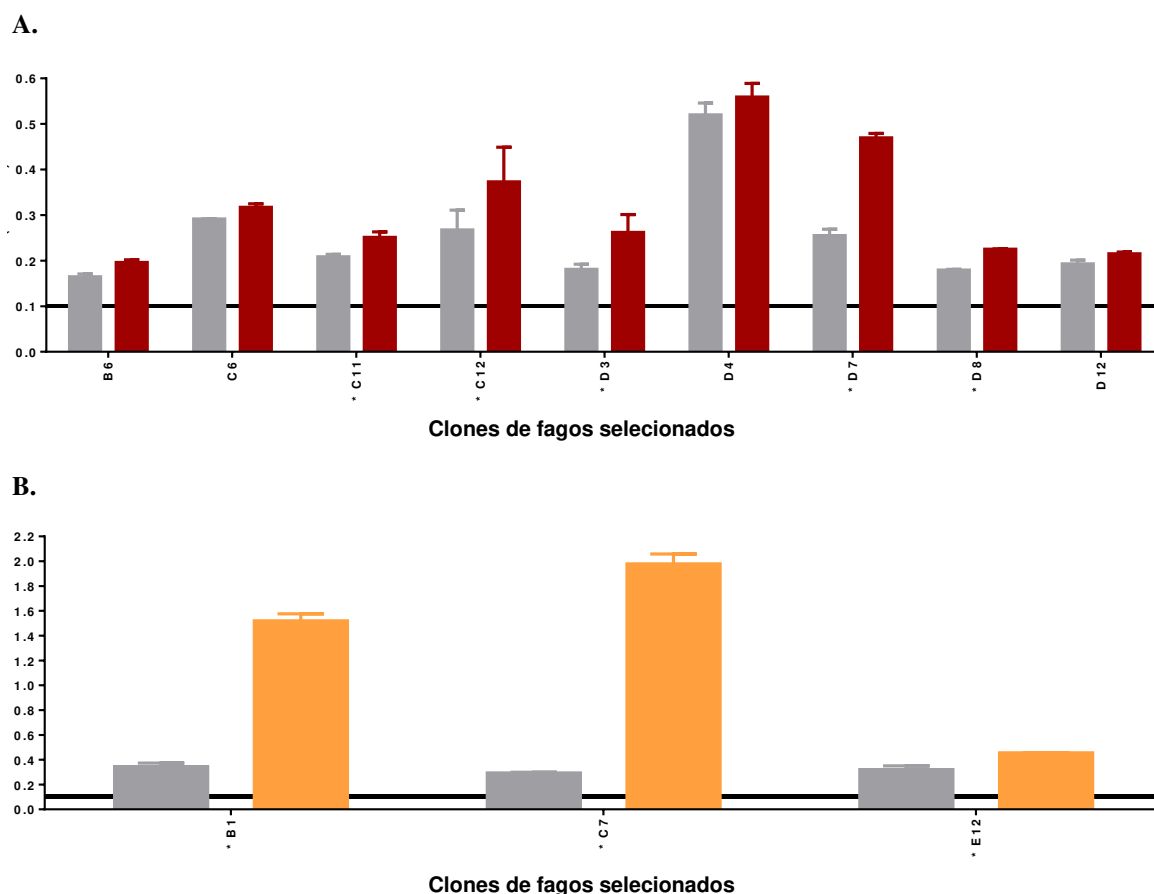
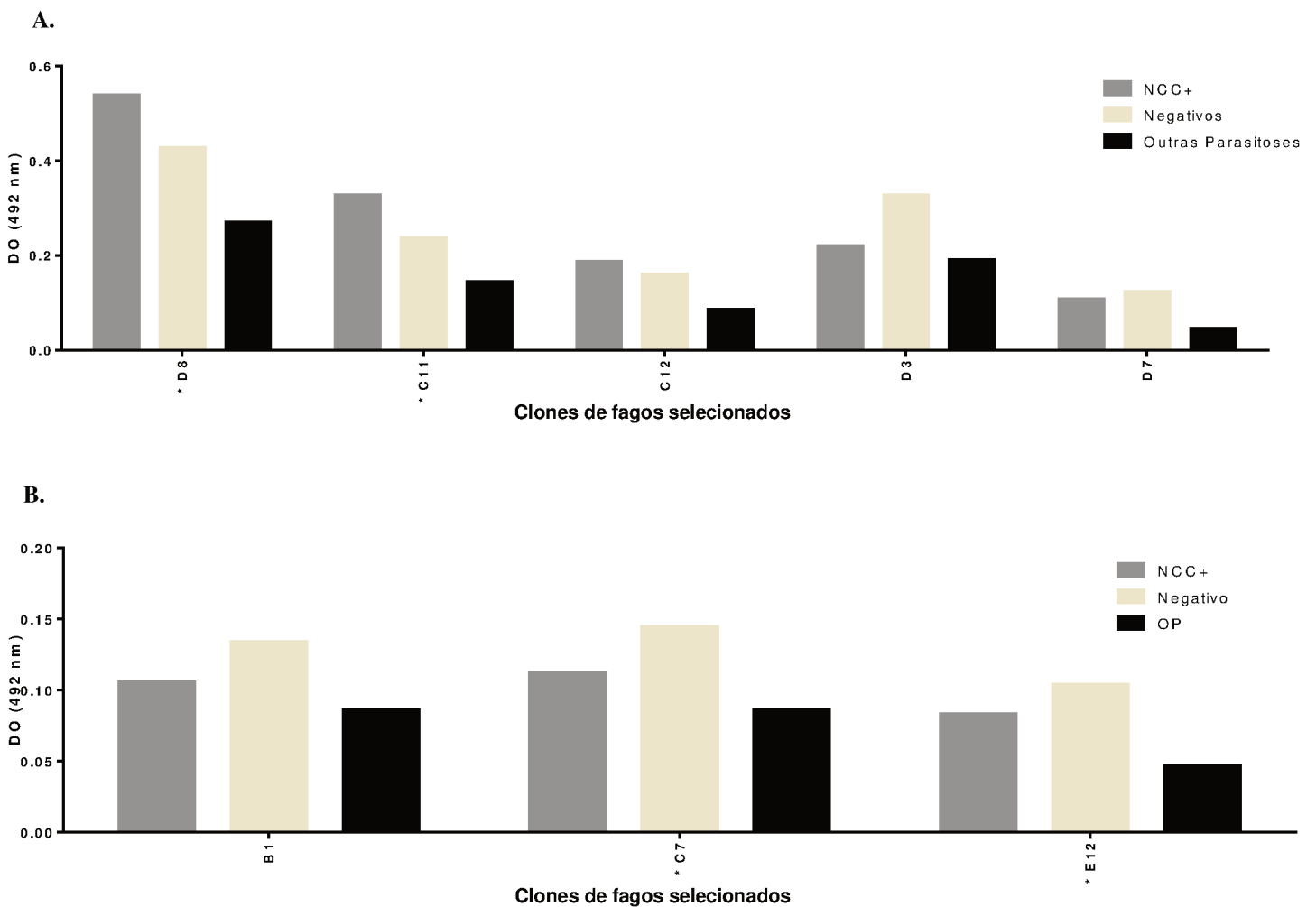


Figura 17. Phage-ELISA para *screening* dos clones de fagos selecionados para o diagnóstico sorológico da NCC humana. Foram utilizados *pool* de soros aleatórios de pacientes com NCC confirmada, pacientes saudáveis e pacientes com outras infecções parasitárias. Um clone de fago selvagem (irrelevante) foi utilizado como controle. **(A)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 1 (IgY anti-Tc); **(B)** Clones de fagos selecionados da Estratégia 2 (IgY anti-dTc). * = clones selecionados devido à maior especificidade aos anticorpos IgY anti-Tc e anti-dTc. DO – Densidade óptica a 492 nm.



4.7 Extração e sequenciamento de DNA

As etapas de extração e sequenciamento de DNA foram realizadas para os clones que apresentaram maior relevância nos testes de validação. O DNA dos 4 clones selecionados das estratégias 1 (2 clones) e 2 (2 clones) foram sequenciados. Apenas um clone da estratégia 1 apresentou sequências de aminoácidos válidas, enquanto na estratégia 2 a validação foi observada em ambos (estratégia 1 – C11; estratégia 2 – C7 e E12). Nenhuma das sequências obtidas dos clones de cada estratégia se repetiu.

A similaridade das sequências de aa dos peptídeos com proteínas de *T. crassiceps* (Tabela 3) e *T. solium* (Tabela 4) registradas no *GeneBank* e acessadas pelo BLAST foi observada em todos os clones que apresentaram sequências válidas. A representação de cores iguais nos aminoácidos identificados (Figura 18) indicou semelhanças bioquímicas entre os peptídeos, no entanto, sequências consenso nos alinhamentos não foram constatadas quando o programa Clustal W 2.1 foi utilizado para a análise.

Tabela 3. Similaridade das sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes das moléculas de IgY com proteínas de *T. crassiceps*.

Estratégia/ Clones	Proteínas alinhadas	Sequência de aa	<i>E-value</i>	<i>Query cover (%)</i>	<i>Total score</i>	ID (%)	Número de acesso
Estratégia 1 IgY anti-Tc: C11	Phosphoenolpyruvate carboxykinase, partial [<i>Taenia crassiceps</i>]	KTSPWAK	8,8	71	20,8	80	CBH36499.1
Estratégia 2 IgY anti-dTc: C7	Enolase 4 [<i>Taenia crassiceps</i>]	NPRIPGS	0,13	57	16,8	100	AVI57698.1
Estratégia 2 IgY anti-dTc: E12	Enolase B [<i>Taenia crassiceps</i>]	SKAWHAY	2,6	57	13,4	75	AVI57696.1

aa (aminoácidos); ID (identidade).

Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes das moléculas de IgY com proteínas de *T. solium*

Estratégia/ Clones	Proteínas alinhas	Sequência de aa	E-value	Query cover (%)	Total score	ID (%)	Número de acesso
Estratégia 1 IgY anti- Tc: C11	Tsol15 [<i>Taenia solium</i>]	KTSPWAK	3,9	57	15,1	100	ADH2958 9.1
	Phosphoenolp yrovate carboxykinase, parcial [<i>Taenia solium</i>]		64	71	20,8	80	CBH3649 6.1
	Recname: Full= Sodium/potassium- transporting ATPase subunit alpha; Short = Na (+)/K (+) ATPase subunit alpha [<i>Taenia solium</i>]		1342	28	8,7	100	Q6RWA9 .1
	Serpin [<i>Taenia solium</i>]		1347	28	8,7	100	ATG8340 0.1

Tabela 4. Similaridade das sequências de aminoácidos dos peptídeos ligantes das moléculas de IgY com proteínas de *T. solium* (continuação).

Estratégia/ Clones	Proteínas alinhas	Sequência de aa	<i>E-value</i>	<i>Query cover</i> (%)	<i>Total score</i>	ID (%)	Número de acesso
Estratégia 2 IgY anti- dTc: C7	Putative proteasome maturation protein [<i>Taenia solium</i>]	NPRIPGS	2,7	71	15,5	80	CAD2152 7.1
	Filamin, partial [<i>Taenia solium</i>]		3,9	71	28,4	100	CAK9616 4.1
	TGTP1 [<i>Taenia solium</i>]		42	71	12,5	80	AAB0591 1.1
	Cystatin [<i>Taenia solium</i>]		1941	28	8,3	100	AIM55117 .1
Estratégia 2 IgY anti- dTc: E12	Gyceraldehyd e-3-phosphate dehydrogenas e[<i>Taenia solium</i>]	SKAWHAY	8,1	42	14,2	100	ABR2422 9.1
	Trypsin-like protein [<i>Taenia solium</i>]		8,1	57	14,2	75	ADP8956 6.1
	Enolase B [<i>Taenia solium</i>]		18	57	13,4	75	AVI26383 .1
	Hypothetical protein [<i>Taenia solium</i>]		142	57	11,2	75	CAD2154 5.1

aa (aminoácidos); ID (identidade).

Figura 18. Análise das sequências de aminoácidos obtidas em múltiplos alinhamentos para a identificação de regiões conservadas ou motivos comuns entre os peptídeos selecionados pelo programa Clustal W 2.1. **A:** clone C11 (estratégia 1 - IgY anti-Tc), **B:** clone C7 (estratégia 2 - IgY anti-dTc) e **C:** clone E12 (estratégia 2 - IgY anti-dTc).

A.			
CBH36499.1 C11	ADKITEELLKSGTIRKLAAYENNYICCTDPKDVARVESKTFICTPDRYGTVPHVAEGVKG		60 0
CBH36499.1 C11	ILGQWISPKLDDESLRDRFPGCMNDRTLYVIPFSMGPIGSPLAKYGIQITDSQYVVLCHR		120 0
CBH36499.1 C11	IMTRMSPKVLVDYIKEQNAFVRLHSIGLPRPHEGVKVINMWPENPEKTIISHIPDORLIM		180 0
CBH36499.1 C11	SFGSGYGGNSLLGKKCFALRIAGRIAYDEGWMAEHMLIMSVTNPKGEEKFVCAAFPSACG		240 0
CBH36499.1 C11	KTNMAMLTPLSLPGWKMVCVDDIAWMRFNDKGELRAINPEAGFFGVAPGTNHKTNPNALE		300 0
CBH36499.1 C11	CCMKNSVLTMVAETDDGRFFWEGLESEYKPETKLTTLNLGKETTVGAKTASPKAHPNSRFC -KTSPWAK-		360 7
		* ; *	
CBH36499.1 C11	CPASQCPIIHPKWEDPAGVPVSVFMFGGRRPEGVPLVYEARTWRHGVMIGAQVKSEATAA		420 7
CBH36499.1 C11	AEFKGRQVMHDPMAWRPFMGYNFGKYLEHWLAMEKPRHMPRIHFVNWFRLDSNGRFAWP		480 7
CBH36499.1 C11	GFGN	484	
	----	7	
B.			
AVI57698.1 C7	MRQQYDDENVIQMYIDSKSSLYGLPQLALIPYQKNCKCIREILVFPRIPSNSYKVFISR -NPRI PGS-		60 7
		**** ..	
AVI57698.1 C7	LYSEAFQPPVADKMEQMLDFAISFLRERNLENTFYLTLVCEPYAFYNEVKGKYEPTKGAF		120 7
AVI57698.1 C7	KSASEMVHVYANLLQAYPHIKILTNPFRTEWHAWLKLQETIKNLDNCHFVEICASSDAL		180 7
AVI57698.1 C7	DTGLVLRLSPSPSISEMAYLVNRTSNNLDES DRKHTFGISNIIGIDGTFGAQTSCCFLLD		240 7
AVI57698.1 C7	IAEAILWVKCE	251	
	-----	7	

C.		
AVI57696.1 E12	MTMLRIVGRQILD SRGNPTVEVDVITHRGLFRASVPSGASTGLHEACELRDNNAQEFNGL	60 0
AVI57696.1 E12	GVKHAVRNINEIIGPALLKKDLLVTQQA EID SFMVN ELDGTPNK SRLGANAILGVSLAVL	120 0
AVI57696.1 E12	KAGAAEKRIPLYRHVANMAGVTRVTL PVP AFNVINGGKHAGNKLPMQEFMILPVGAKSFA	180 0
AVI57696.1 E12	EALRMGTETFHHLKNIIRRKYGIDACNVGDEGGFAPNVSGAHEALDLLTEAITTANYCGK	240 0
AVI57696.1 E12	IVIGMDVAASELYENGYNLGFK EAKRDPGONITAERLMALYNELLARYPIVSIEDPFDQ	300 0
AVI57696.1 E12	DDWEPWVLFTRQSRIQIVGDDLTVTNVQRVQKAIDMGACNCLLLKVNQIGTFTEALAATK	360 0
AVI57696.1 E12	LAQSKGMMVMSHRSGETEDSTIADIVVGLMVGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEEELG --SKAHAY-- **.*:.	420 7
AVI57696.1 E12	NHAVFAGESFKHILNPIK	438 7

4.8 Phage-ELISA no diagnóstico sorológico da NCC humana

Os clones de fagos selecionados nas duas estratégias de *biopanning* (IgY anti-Tc e IgY anti-dTc) considerados específicos a *T. crassiceps* foram amplificados, quantificados e avaliados por *phage*-ELISA como potencial ferramenta diagnóstica para a NCC humana. O potencial dos clones no diagnóstico sorológico foi avaliado por meio da aplicação dos mesmos na detecção de anticorpos IgG em amostras de pacientes com NCC confirmada, com outras infecções parasitárias e de indivíduos saudáveis, e os resultados de reatividade obtidos foram, respectivamente: **(C11)** 80% (24/30), 10% (3/30) e 23,3% (7/30); **(C7)** 66,7% (20/30), 30% (9/30) e 13,3% (4/30); **(E12)** 70% (21/30), 30% (9/30) e 20% (6/30) (Figura 19). Amostras de soro que apresentaram IE > 1,0 nos testes diagnósticos foram consideradas positivas. Nenhuma reatividade cruzada foi observada quando utilizada amostras de pacientes infectados com *E. granulosus* (0%; 0/5). A reatividade apresentada por pacientes com outras infecções parasitárias utilizando os clones de fagos das duas estratégias de seleção estão apresentadas na Tabela 5.

Os parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, razões de probabilidades e

acurácia estão demonstrados na tabela 6. Valores de RP+ entre 2 e 5 indicam um pequeno aumento na probabilidade da doença; enquanto RP- entre 0,2 e 0,5 indicam pequeno decréscimo na probabilidade da doença.

As análises por *one-way* ANOVA mostraram diferenças significativas entre os três grupos analisados quando utilizado o fago C11 ($F = 31,01$; $p < 0,0001$). O pós-teste de múltiplas comparações de Tukey apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação dos valores de IE do grupo I (média = 1,920) com o grupo II (média = 0,5033) (diferença média = 1,417; 0,9664-1,867, 95% IC) e valores de IE do grupo I com o grupo III (média = 0,8200) (diferença média = 1,100, 0,6498-1,550, 95% IC) ($p < 0,0001$). Os grupos II e III não apresentaram diferença estatisticamente significativa (diferença média = -0,3167, -0,7669-0,1336, 95% IC). Diferenças significativas também foram observadas entre os grupos I e II e I e III quando utilizado o fago C7 ($F = 22,08$; $p < 0,0001$) e E12 ($F = 14,60$; $p < 0,0001$). O pós-teste de múltiplas comparações de Tukey apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação dos valores de IE do grupo I (C7, média = 1,767; E12, média = 1,640) com o grupo II (C7, média = 0,7967; E12, média = 0,8367) e valores de IE do grupo I com o grupo III (C7, média = 0,5967; E12, média = 0,7133). Os grupos II e III não apresentaram diferença estatisticamente significativa (C7, diferença média = 0,2000; -0,2491-0,6491, 95% IC; E12, diferença média = 0,1233, -0,3207, -0,5674, 95% IC).

Análises entre os três fagos utilizados das duas estratégias também foram realizadas e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (G1, $F = 0,5580$; $P = 0,5744$; G2, $F = 2,749$; $P = 0,0695$; G3, $F = 2,220$; $P = 0,1148$).

Figura 19. Detecção de IgG anti-*Taenia* sp. por ELISA utilizando clones de fagos selecionados da estratégia 1 (A, C11) e da estratégia 2 (B, C7; C, E12). Amostras de soro de pacientes com NCC confirmada (GI; n = 30); pacientes com outras infecções parasitárias (GII; n = 30) e indivíduos saudáveis (GIII; n = 30) foram testadas. A linha pontilhada indica o *cut-off* (Índice ELISA > 1). As barras horizontais indicam a média e as verticais os desvios padrões.

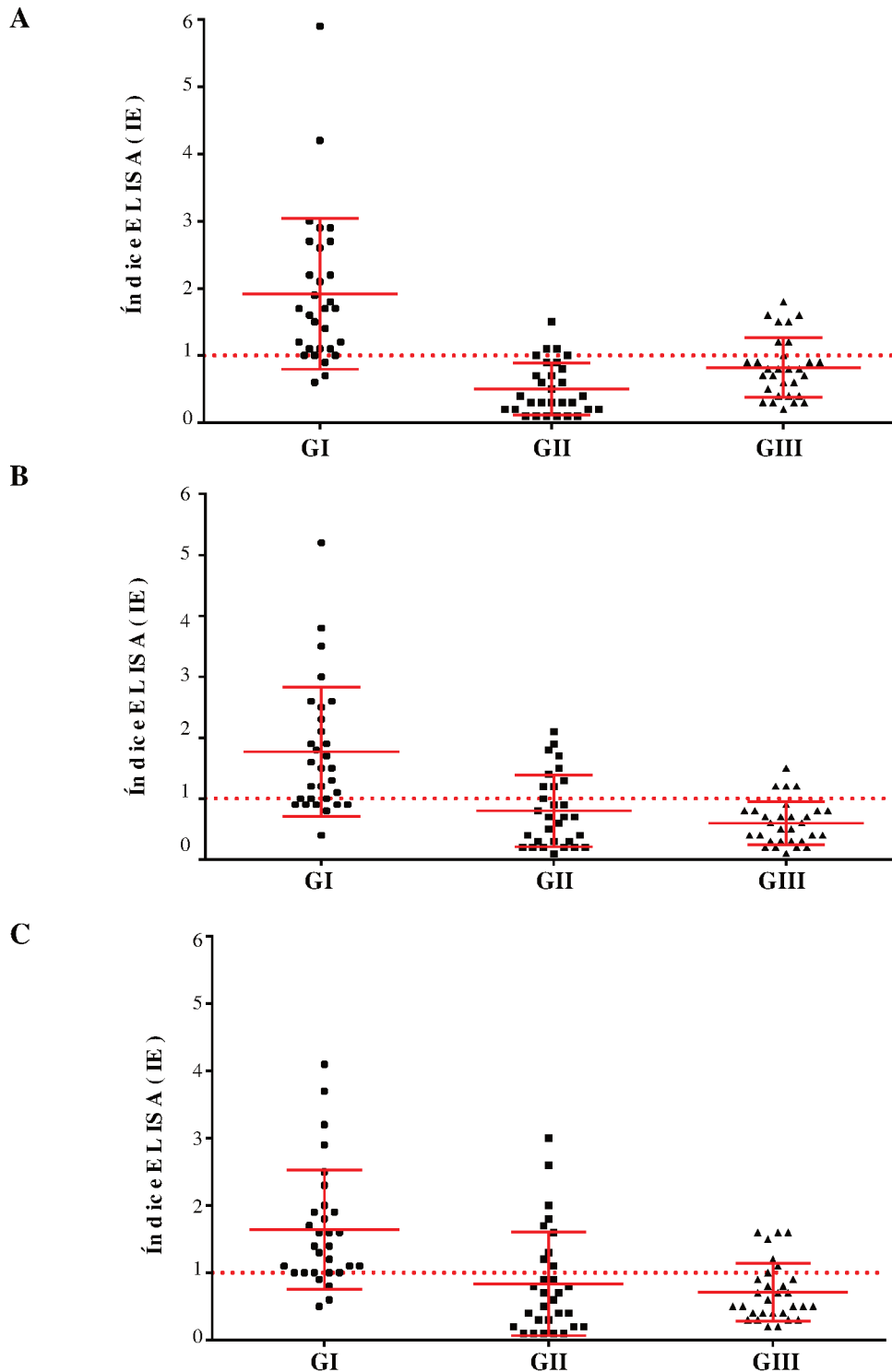


Tabela 5. Reatividade das amostras de pacientes com outras infecções parasitárias quando utilizado os clones de fagos da estratégia 1 (C11) e da estratégia 2 (C7, E12).

Amostras de soros	Amostras reativas (IE > 1,0)		
	Clones		
	C11	C7	E12
Outras parasitoses			
Ancilostomatídeos (n = 5)	-	1	1
<i>Ascaris</i> sp. (n = 2)	-	-	-
<i>Enterobius vermicularis</i> (n = 3)	-	2	2
<i>Hymenolepis nana</i> (n = 2)	1	-	1
<i>Schistosoma mansoni</i> (n = 6)	1	2	1
<i>Strongyloides stercoralis</i> (n = 6)	1	4	4
<i>Taenia</i> sp. (n = 1)	-	-	-
<i>Echinococcus granulosus</i> (n = 5)	-	-	-
Total (n = 30)	3	9	9
	(10%)	(30%)	(30%)

IE: Índice ELISA.

Tabela 6. Parâmetros diagnósticos dos clones de fagos selecionados nas duas estratégias analisados por ELISA.

Clones	Valores Diagnóstico				
	Se%	Es%	RP+	RP-	Acc%
Estratégia 1					
C11	80	83,3	4,79	0,24	82
Estratégia 2					
C7	66,7	78,3	3,07	0,43	74
E12	70	75	2,8	0,40	73

sensibilidade (Se), especificidade (Es), razão de probabilidade positiva (RP+), razão de probabilidade negativa (RP-), acurácia (Acc).

5. DISCUSSÃO

Os anticorpos são amplamente utilizados em pesquisa, diagnóstico e terapia devido à sua capacidade de se ligar a alvos específicos (GREUNKE *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2019). A imunoglobulina da gema de ovo (IgY) é um anticorpo presente em aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados e, devido à sua importância, tem sido intensivamente estudada (AMRO; AL-QAISI; AL-RAZEM, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019).

A resposta imune das aves é influenciada pela dose de antígeno e a utilização de 10 a 100 µg de antígeno por mL injetado é comum. O antígeno heterólogo de *T. crassiceps* utilizado substitui de forma eficiente o de *T. solium*, sendo este de difícil obtenção a partir de suínos naturalmente infectados (SILVA *et al.*, 2017). A concentração de anticorpos na gema do ovo pode ser muito aumentada por meio de inoculações de reforço e cerca de 100-200 mg de IgY total podem ser obtidos a partir de um único ovo, com 2-10% correspondendo à IgY específica (MUNHOZ *et al.*, 2014; MÜLLER *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019), ou seja, os anticorpos IgY obtidos neste estudo apresentaram alto rendimento (4,9-6,1 mg/mL) após extração a partir do *pool* semanal das gemas dos ovos.

A utilização de adjuvantes de Freund e extratos antigênicos na imunização das galinhas é comum (FARIA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; CARRARA *et al.*, 2020), no entanto, processos inflamatórios locais e queda na produção de ovos podem ocorrer. Assim, a imunização em quatro pontos distintos da musculatura peitoral pode favorecer a minimização destes efeitos (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996; CHALGHOU MI *et al.*, 2008). Durante a experimentação animal deste estudo, nenhum processo inflamatório derivado das imunizações foi observado.

Os anticorpos IgY obtidos da gema do ovo podem ser detectados cerca de 4-6 dias após a primeira imunização. As galinhas geralmente são imunizadas intramuscularmente no músculo peitoral, o que frequentemente resulta em níveis mais altos de anticorpos no 28º dia após a imunização. Os anticorpos específicos continuam a ser produzidos por mais de 200 dias e, na gema de ovo, o título de IgY permanece muito alto por um longo período (MUNHOZ *et al.*, 2014; MÜLLER *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2019). Neste estudo, os anticorpos IgY foram detectados uma semana após a primeira imunização, com altos níveis observados na sexta e oitava semana, corroborando com o estudo realizado por LOPES *et al.* (2019), no qual as galinhas foram imunizadas com extrato antigênico de *Ascaris suum*.

A produção de IgY permite a obtenção de anticorpos com alta afinidade e avidéz (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). No entanto, sabe-se que anticorpos com baixa avidéz são produzidos durante os estágios iniciais da resposta imune, ocorrendo aumento progressivo da avidéz após várias imunizações em galinhas (BORGES *et al.*, 2018). CARRARA *et al.* (2020) apresentaram dados que mostravam altos índices de avidéz, variando de 66,1% (segunda semana) a 95,08% (oitava semana) após testarem anticorpos produzidos contra fração antigênica de *T. crassiceps*. Considerando IA > 60% como alta avidéz (VILIBIC-CAVLEK *et al.*, 2016), valores similares foram obtidos no presente estudo, no qual índices mais altos de avidéz foram observados variando de 65,8% a 95,8%, o que demonstra uma maior avidéz dos anticorpos após a terceira imunização.

Vários métodos de isolamento e purificação de IgY a partir da gema de ovo são relatados, e a escolha de um método específico depende da finalidade, custo dos materiais, escala de extração, tecnologia, aplicação final e se requer diferentes graus de purificação (MUNHOZ *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019). Akita & Nakai (1993) sugeriram que o procedimento mais eficiente e econômico para a recuperação de IgY da gema de ovo em larga escala é o método de diluição em água sob condições ácidas. Além disso, a cromatografia em coluna é frequentemente utilizada em uma etapa final após precipitação. Após cinco anos de armazenamento a 4 °C, a IgY isolada por afinidade mantém alta atividade (MUNHOZ *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019).

O *pool* de anticorpos IgY isolado foi aplicado em diferentes ensaios imunológicos para confirmação da sua especificidade por meio do reconhecimento dos alvos antigênicos. A aplicação de IgY em ensaios de *immunoblotting* e imunofluorescência tem sido relatada em vários estudos (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2018; FARIA *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019; CARRARA *et al.*, 2020). No presente estudo, bandas polipeptídicas nas regiões de 24-215 kDa foram detectadas pela IgYi anti-Tc, mostrando a especificidade desses anticorpos. Atenção especial deve ser dada à banda polipeptídica na região de 70 kDa, um importante marcador para o diagnóstico da NCC (BARCELOS *et al.*, 2007) que foi claramente identificado pela IgYi.

Tini *et al.* (2002) utilizaram a IgY isolada por afinidade na reação de imunofluorescência indireta com sucesso, o que também foi observado em nosso estudo, uma vez que a IgYi anti-Tc foi aplicada nos cortes histológicos de metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium*, resultando em intensa fluorescência. Além disso, a fluorescência apresentada nos cortes de tecidos de metacestódeos de *T. solium* demonstra reatividade cruzada entre os parasitos, apresentando a potencial aplicabilidade do IgY anti-Tc na detecção de cisticercose por *T. solium*.

A IgY mostra vantagens em vários campos da medicina, principalmente no diagnóstico. A reatividade cruzada em ensaios imunológicos é eliminada, uma vez que a IgY não reage com os receptores de mamíferos (MUNHOZ *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017). Anticorpos IgY específicos aos parasitos *Plasmodium falciparum* (QU *et al.*, 2011), *Cryptosporidium parvum* (KOBAYASHI *et al.*, 2004), *Toxoplasma gondii* (FERREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2012), *Schistosoma japonicum* (LEI *et al.*, 2012), *Trichinella spiralis* (LIU *et al.*, 2013), *T. solium* (MANHANI *et al.*, 2011) *Strongyloides venezuelensis* (FARIA *et al.*, 2019) e *A. suum* (LOPES *et al.*, 2019) foram relatados.

Nesse contexto, os anticorpos IgY anti-Tc provaram ser úteis no imunodiagnóstico do NCC. Imunocomplexos circulantes, formados pela combinação dos anticorpos produzidos com determinantes antigênicos após estímulo antigênico (LOPES *et al.*, 2019), foram detectados de forma eficiente pelos anticorpos IgY anti-Tc. Embora o antígeno utilizado na imunização das galinhas apresente proteínas solúveis e os anticorpos produzidos tenham detectado antígeno de membrana nos cortes histológicos, não foi observada reatividade cruzada nos pacientes com teníase. A sensibilidade (83,3%) e a especificidade (96,7%) alcançadas em nosso estudo são semelhantes às descritas previamente (CARRARA *et al.*, 2020). Reações cruzadas no grupo II foram observadas em apenas duas amostras (6,7%) de pacientes infectados com *E. granulosus*. Apesar de ser um anticorpo produzido contra um extrato antigênico total (Tc), os resultados aqui obtidos são superiores aos obtidos por Carrara *et al.* (2020), nos quais a taxa de reatividade cruzada em amostras de pacientes infectados por outros parasitos atingiu 11,43%, sendo observada reatividade em pacientes infectados com *E. granulosus* (1/5), *H. nana* (1/4), *S. mansoni* (1/3) e *T. trichiura* (1/1) quando testados anticorpos IgY produzidos contra fração detergente de *T. crassiceps*.

No estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2012), a aplicação de anticorpos IgG produzidos em coelhos contra larvas filarioides (iL3) e fêmeas partenogênicas (Fp) de *S. venezuelensis* na detecção de imunocomplexos apresentou resultados divergentes daqueles obtidos por Faria *et al.* (2019), que utilizou anticorpos IgY produzidos contra os mesmos estágios do parasito. No primeiro estudo, foi observada reatividade cruzada de 20% quando utilizada IgG anti-iL3 e de 36,67% quando utilizada IgG anti-Fp.; e no segundo, os valores obtidos foram de 15,56% (IgY anti-iL3) e 11,11% (IgY anti-Fp), demonstrando menor reatividade cruzada no diagnóstico sorológico da estrogiloidíase quando utilizados anticorpos IgY obtidos de gemas de ovos de galinhas.

A busca por ferramentas que proporcionem maior sensibilidade e especificidade no imunodiagnóstico da NCC humana nos induziu à aplicação dos anticorpos IgY anti- Tc na

detecção de imunocomplexos circulantes em amostras de soro e à seleção de peptídeos com afinidade de ligação aos anticorpos IgY anti-Tc e IgY anti-dTc por *phage-display*. A seleção de peptídeos específicos pode ser uma alternativa aos antígenos totais, uma vez que elevadas concentrações (UFC) de fagos podem ser amplificadas para aplicação diagnóstica (RAMACHANDRAN *et al.*, 1998). Os bacteriófagos podem ser utilizados na análise e subsequente clonagem da proteína de interesse com boa eficiência, mesmo apresentando poucos peptídeos recombinantes em sua superfície (GNANASEKAR; PADMAVATHI; RAMASWAMY, 2005). A finalidade diagnóstica de seleção de peptídeos por *phage display* tem sido demonstrada em diversos estudos (RIBEIRO *et al.*, 2010; MANHANI *et al.*, 2011; FELICIANO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016; SALLES *et al.*, 2017).

A seleção de fagos foi realizada utilizando-se duas estratégias: estratégia 1 (IgY anti-Tc) e estratégia 2 (IgY anti-dTc). Em ambas as estratégias de seleção, foi utilizada uma biblioteca de peptídeos de sete aminoácidos conformacionais (Ph.D.-C7C) expressos em fagos filamentosos M13. Com o objetivo de evitar possíveis casos de reatividade cruzada no diagnóstico sorológico, a seleção negativa de clones foi realizada com anticorpos IgY inespecíficos produzidos pelas galinhas.

Após os ciclos de *biopanning*, os clones de fagos foram validados pelos testes ELISA e selecionados de acordo com sua especificidade ao alvo. O *phage-ELISA* para *screening* dos clones de fagos potencialmente aplicáveis no diagnóstico sorológico da NCC humana resultou na seleção de quatro clones de fagos (C11 e D8, estratégia 1; C7 e E12, estratégia 2) e submetidos ao sequenciamento de DNA para dedução das sequências de aminoácidos. As sequências de peptídeos válidas (clones C11, C7 e E12) apresentaram diferentes graus de similaridade com proteínas de *T. crassiceps* e *T. solium* indicados pela ferramenta BLASTp. Os resultados de *E-value* indicaram se o alinhamento foi real ou ocorreu meramente pelo acaso no banco de dados; quanto menor o *E-value*, menor a probabilidade do alinhamento ocorrer ao acaso (AMARAL; REIS; SILVA, 2007); no entanto, maiores valores de *E-value* foram encontrados neste estudo, indicando assim maior probabilidade de alinhamento ao acaso. Os alinhamentos também apresentaram baixos valores de *Score* (< 30), demonstrando que o número de pareamentos perfeitos entre a sequência obtida e a presente no banco de dados foi pequeno.

A identidade também foi avaliada, indicando a similaridade por meio da soma do número de aminoácidos idênticos e os que são diferentes na comparação, mas que apresentam *score* positivo (AMARAL; REIS; SILVA, 2007). Considerando esses parâmetros (*E-value*, *Score* e Identidade), melhores resultados foram apresentados pelos clones C11 (estratégia 1) e

C7 (estratégia 2). O principal alinhamento em relação ao clone C11 ocorreu com a proteína Tsol15 de *T. solium*, que pertence à família de antígenos de 45W e é conhecida por ser expressa na superfície das oncosferas, sendo proposta como um antígeno diagnóstico (LUNDSTRÖM *et al.*, 2010). O clone C7 apresentou principal similaridade com as proteínas enolase 4 de *T. crassiceps*, *putative proteasome maturation protein* e *filamin, partial* de *T. solium*. A enolase é uma enzima glicolítica encontrada em várias espécies de helmintos (JOLODAR *et al.*, 2003; BERNAL *et al.*, 2004; MARCILLA *et al.*, 2007; TORRE-ESCUADERO *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; AYÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2018); sua designação foi proposta como EnoA, EnoB, EnoC e Eno4 com o objetivo de enfatizar as isoformas não ortólogas de seus homólogos vertebrados (AYÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2018). A enzima é expressa no tegumento da forma metacestódea e apresenta capacidade de ativação de plasminogênio (ZHANG *et al.* 2015; AYÓN-NÚÑEZ *et al.*, 2018), sendo recentemente descrita como uma potencial candidata a vacina (YANG *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2012). A proteína de maturação putativa do proteossoma (*putative proteasome maturation protein*) é essencial para a maturação do complexo proteolítico do núcleo do proteossoma 20S (PIAO *et al.*, 2019) enquanto a filamina (*filamin*) é uma proteína de excreção/secreção do metacestódeo que possui diversidade de ligação; é conectora de diversas proteínas responsáveis pela transdução e tradução de sinais, além de serem ligantes mecânicas de filamentos de actina. A filamina de *S. mansoni* possui alto potencial vacinal, uma vez que é associada ao tegumento do parasito (MOHAMED *et al.*, 2008; VICTOR *et al.*, 2013).

Quando comparados os valores resultantes dos testes de aplicação diagnóstica (*Phage-ELISA*) utilizando clones das estratégias 1 e 2, melhores parâmetros diagnósticos foram obtidos da seleção de clones ligantes dos anticorpos IgY anti-Tc (C11, estratégia 1). A sensibilidade constatada neste estudo, considerando os melhores resultados quando utilizando o clone de fago C11, corrobora com o estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2010), que ao selecionar peptídeos capazes de detectar anticorpos IgG circulantes em pacientes com NCC, obtiveram sensibilidade de 80% quando utilizado o clone NC₂2. No presente estudo a sensibilidade e acurácia foram maiores quando utilizado o clone de fago C11, comparado com os valores obtidos por Manhani *et al.* (2011), estudo no qual peptídeos recombinantes contra IgY anti-*T. solium* foram selecionados. No entanto, uma menor especificidade é observada neste quando comparado com o estudo anteriormente mencionado.

Os resultados das duas ferramentas de diagnóstico empregadas neste estudo foram comparados. Melhores parâmetros foram evidenciados quando anticorpos IgY isolados anti-Tc foram aplicados na detecção de imunocomplexos circulantes em relação ao segundo método,

no qual clones de fagos expressando peptídeos ligantes de moléculas de IgY anti-Tc foram selecionados para identificação de anticorpos IgG no imunodiagnóstico da NCC humana. Foi observada menor especificidade quando empregada a segunda técnica, uma vez que os bacteriófagos naturalmente encontrados na microbiota intestinal de trato digestivo de humanos resultam em resposta do sistema imunológico, o que pode ocasionar maior número de casos falso positivos utilizando os testes *phage-ELISA* (MIRZAEI; MAURICE, 2017; NAVARRO; MUNIESA, 2017). Além disso, resultados falso-negativos podem estar associados à casos assintomáticos da doença (REY, 2008) ou ainda ocorrer em casos de NCC parenquimal, como sugerido por ZINI; FARREL; WADEE (1990).

A obtenção do antígeno do parasito é cada vez mais difícil devido aos progressos dos programas de erradicação da cisticercose. Assim, uma alternativa simples e de baixo custo em aplicações diagnósticas são os antígenos proteicos sintéticos (SCHEEL *et al.*, 2005). Além disso, a síntese de peptídeos sintéticos produzidos a partir de sequências originadas por *phage-display* seria uma alternativa para eliminação da reatividade cruzada, uma vez que resultados promissores foram obtidos quando esses peptídeos foram utilizados no diagnóstico de infecções parasitárias (NOYA *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2010; FELICIANO *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017).

Os resultados deste estudo demonstram que os anticorpos IgY anti-Tc são altamente específicos, apresentando eficiência e potencial aplicabilidade como ferramenta no imunodiagnóstico da NCC humana. Ressalva-se que este é um teste preliminar e um painel maior de amostras de soro deve ser avaliado para corroborar com sua eficiência. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar o potencial dos anticorpos IgY anti-Tc na terapia e na formulação de protocolos de vacina humana e suína, bem como a aplicabilidade de peptídeos sintéticos produzidos a partir das sequências obtidas neste estudo por *phage-display* no imunodiagnóstico de NCC humana.

6. CONCLUSÃO

- Galinhas imunizadas com extrato salino total de formas metacestódeas de *T. crassiceps* produziram anticorpos com alta rentabilidade, especificidade e avidéz;
- As imunoglobulinas Y anti-Tc isoladas foram eficazes como ferramenta no diagnóstico sorológico da NCC humana, detectando imunocomplexos circulantes em soros de pacientes que apresentavam a doença, diferenciando-os dos grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras parasitoses;
- Os clones de fagos selecionados, ligantes de moléculas de IgY anti-Tc e anti-dTc, apresentaram similaridades estruturais com proteínas de *T. crassiceps* e *T. solium* e aplicabilidade no imunodiagnóstico da neurocisticercose humana;
- Novos estudos utilizando os clones de fagos selecionados devem ser realizados no intuito de eliminar a reatividade cruzada, melhorando os resultados para o imunodiagnóstico da neurocisticercose humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAPEJEV, S. Aspectos clínicos-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos e Neuro-Psiquiatria**, v. 61, p. 822-828, 2003. doi: 10.1590/S0004-282X2003000500022.
- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v. 160, p. 207-214, 1993. doi: 10.1016/0022-1759(93)90179-b.
- AMARAL, L.; MASCHIETTO, M.; MASCHIETTO R.; CURY, R.; FERREIRA, N. F.; MENDONÇA, R.; LIMA, S. S. Unusual manifestations of neurocysticercosis in MR imaging: analysis of 172 cases. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 61, p. 533-541, 2003. doi: 10.1590/s0004-282x2003000400002.
- AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. **O programa BLAST: guia prático de utilização**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 24, 2007.
- AMRO, W.A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering & Biotechnology**, v. 16, p. 99-103, 2018. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.003.
- ARAP, M. A. Phage display technology: applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 1-9, 2005. doi: 10.1590/S1415-47572005000100001.
- ARAÚJO, A. S.; LOBATO, Z. I.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; VELARDE, D. T. Brazilian IgY-*Bothrops* antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 55, p. 739-744, 2010. doi: 10.1016/j.toxicon.2009.11.004.
- ARCE-SILLAS, A.; ÁLVAREZ-LUQUÍN, D. D.; CÁRDENAS, G.; CASANOVA-HERNÁNDEZ, D.; FRAGOSO G.; HERNÁNDEZ, M.; PROAÑO NARVÁEZ, J. V.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F.; FLEURY, A.; SCIUTTO E.; ADALID-PERALTA L. IL- 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human neurocysticercosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 183, p. 271–279, 2015. doi: 10.1111/cei.12709.
- AROCKER-METTINGER, E.; HUBER-SPITZY, V.; AUER, H.; GRABNER, G.; STUR M. *Taenia crassiceps* in the anterior chamber of the human eye. A case report. **Klinische Monatsblätter fur Augenheilkunde**, v. 201, p. 34-37, 1992. doi: 10.1055/s-2008-1045865.
- ARRUDA, G. C.; DA SILVA, A. D. T.; QUAGLIATO, E. M. A. B.; MARETTI, M. A.; ROSSI, C. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 10, p. 1005-1012, 2005. doi: 10.1111/j.1365-3156.2005.01480.x.
- ASSANA, E.; LIGHTOWLERS, M. W.; ZOLI, A. P.; GEERTS, S. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Africa: risk factors, epidemiology and prospects for control using vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 195, p. 14-23, 2013. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.022.

AYÓN-NÚÑEZ, D.A.; FRAGOSO, G.; ESPITIA, C.; GARCÍA-VARELA, M.; SOBERÓN, X.; ROSAS, G.; LACLETTE, J. P.; BOBES, R. J. Identification and characterization of *Taenia solium* enolase as a plasminogen-binding protein. **Acta Tropica**, v. 182, p. 69-79, 2018. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.02.020.

AZZAY, H.M.E.; HIGHSMITH, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002. doi: 10.1016/s00099120(02)00343-0.

BAERMANN, G. Eine Einfache Methode zur Auffinding von *Ankylostomum* (Nematoden) Larven in Erdproben. Mededeel. Mit H. Geneesk. **Laboratories Weltevreden Feestbundel**, p. 41-47, 1917.

BARCELOS, I. S. C.; FERREIRA, M. S.; MOURA, L. P.; BIONDI, G. F.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of the paired samples (cerebrospinal fluid and serum) in immunodiagnostic of active and inactive human neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 427-429, 2005. doi: 10.1590/s0074-02762005000400014.

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

BARCELOS, I. S. C.; MOURA, L. P.; COSTA, V. P.; FERREIRA, M. S.; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia solium* metacestodes immunodominant peptides recognized by IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum paired samples from patients with active and inactive neurocysticercosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 713-717, 2007. doi: 10.1590/s0074-02762007005000084.

BARNETT, E. V. Circulating immune complexes: their biologic and clinical significance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 78, p. 1089-1096, 1986. doi: 10.1016/0091-6749(86)90252-6.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 1-33, 2001. doi: 10.1016/s0734-9750(00)00054-9.

BERNAL, D., DE LA RUBIA, J.E., CARRASCO-ABAD, A.M., TOLEDO, R., MAS-COMA, S., MARCILLA, A. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. **FEBS Letters**, v. 563, p. 203-206, 2004. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00306-0.

BORGES, I., SILVA, M., SANTIAGO, F., FARIA, L., FERREIRA-JÚNIOR, A., 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. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178.

- BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas apresentadas em FAGOS. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 26, p. 44-51, 2002. BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. D.; LIVRAMENTO, J. A. Detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, p. 18-24, 2000a. doi: 10.1590/s0004-282x2000000100003.
- BUENO, E. C.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. D.; LIVRAMENTO, J. A.; MIELLE, S. R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 146-151, 2000b. doi: 10618078.
- BUENO, E. C.; SNEGE, M.; VAZ, A. J.; LESER, P. G. Serodiagnosis of human cysticercosis by using antigens from vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 1140-1144, 2001. doi: 10.1128/CDLI.8.6.1140-1144.2001.
- CARABIN, H.; WINKLER, A. S.; DORNY, P. *Taenia solium* cysticercosis and taeniosis: Achievements from the past 10 years and the way forward. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, p. 1-5, 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0005478.
- CARPIO, A.; ESCOBAR, A.; HAUSER, W. A. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. **Epilepsia**, v. 39, p. 1025-1040, 1998. doi: 10.1111/j.1528-1157.1998.tb01287.x.
- 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. doi: 10.1080/14737175.2018.1451328.
- CARRARA, G. M. P.; SILVA, G. B.; FARIA, L. S.; NUNES, D. S.; RIBEIRO, V. S.; LOPES, C. A.; GONÇALVES-PIRES, M. D. R. F.; SANTOS, M. M.; BORGES, I. P.; FERREIRA-JUNIOR, Á.; ÁVILA, V. M. R.; COSTA-CRUZ, J. M. IgY antibody and human neurocysticercosis: a novel approach on immunodiagnosis using *Taenia crassiceps* hydrophobic antigens. **Parasitology**, v. 147, p. 240-247, 2020. doi: 10.1017/S0031182019001446.
- CHALGHOUMI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, v. 87, p. 32-40, 2008. doi: 10.3382/ps.2007-00252.
- CHAVARRÍA, A.; FLEURY, A.; GARCIA, E.; MARQUEZ, C.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. **Clinical Immunology**, v. 116, p. 271-278, 2005. doi: 10.1016/j.clim.2005.04.008.
- CHEN, N.; YUAN, Z. G.; XU, M. J.; ZHOU, D. H.; ZHANG, X. X.; ZHANG, Y. Z.; WANG, X. W.; YAN, C.; LIN, R. Q.; ZHU, X. Q. *Ascaris suum* enolase is a potential vaccine candidate against ascariasis. **Vaccine**, v. 30, p. 3478-3482, 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.075.
- CHO, T. A. Helminthic infections of the central nervous system. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, v. 24, p. 1489-1511, 2018. doi: 10.1212/CON.0000000000000646.

COELHO, E. A. F.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, L. E.; TAVARES, C. A.P.; SOTO, M.; GOULART, L. R. Theranostic applications of phage display to control leishmaniasis: selection of biomarkers for serodiagnostics, vaccination, and immunotherapy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 370-379, 2015. doi: 10.1590/0037-8682-0096-2015.

COSTA, J. M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraquidiano. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 44, p. 15-31, 1986. doi: 10.1590/S0004-282X1986000100002.

COSTA, J. M.; FERREIRA, A. W.; MAKINO, M. M.; CAMARGO, M. E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 337-341, 1982. doi: 6763759.

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

COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C.; VAZ, E. R.; RAMOS, F. F.; MENEZES-SOUZA, D.; DUARTE, M. C.; ROATT, B. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; TAVARES, C. A.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, M.O.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39-45, 2016. doi: 10.1016/j.jim.2016.04.005.

COSTA, L. E.; SALLES, B. C.; SANTOS, T. T. O.; RAMOS, F. F.; LIMA, M.P.; LIMA, M. I. S.; PORTELA, A. S. B.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DUARTE, M. C.; MENEZES-SOUZA, D.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SILVEIRA, J. A. G.; MAGALHÃES-SOARES, D. F.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 14-22, 2017. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.020.

COYLE, C. M. Neurocysticercosis: an individualized approach. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, p. 153-168, 2019. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.007.

COYLE, C. M.; MAHANTY, S.; ZUNT, J. R.; WALLIN, M. T.; CANTEY, P. T.; WHITE, A. C. JR.; O'NEAL, S. E.; SERPA, J. A.; SOUTHERN, P. M.; WILKINS, P.; MCCARTHY, A. E.; HIGGS, E. S.; NASH, T. E. Neurocysticercosis: neglected but not forgotten. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, p. 1-3, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001500.

DA SILVA, A. V. M.; TAKAYANAGUI, O. M. Teníase e cisticercose – In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana** 13ª ed. Atheneu, São Paulo, p. 245-255, 2016.

DÁVALOS-PANTOJA, L.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; HIDALGO-ALVAREZ, R. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **Journal of Biomaterials Science**, v. 11, p. 657-673, 2000. doi: 10.1163/156856200743931.

DAVISON, F.; MAGOR, K. E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**. Elsevier: San Diego, 2008. p. 481.

DEL BRUTTO, O. H. Diagnostic criteria for neurocysticercosis, revisited. **Pathogens and Global Health**, v. 106, p. 299–304, 2012a. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000025.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis: a review. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-8, 2012b. doi: 10.1100/2012/159821.

DEL BRUTTO, O. H.; NASH, T. E.; WHITE, A. C. JR.; RAJSHEKHAR, V.; WILKINS, P. P.; SINGH, G.; VASQUEZ, C. M.; SALGADO, P.; GILMAN, R. H.; GARCIA, H. H. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 372, p. 202–210, 2017. doi: 10.1016/j.jns.2016.11.045.

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. doi: 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. doi: 10.1016/0022-510x(96)00130-x.

DELGADO-GARCÍA, G.; MÉNDEZ-ZURITA, V. A.; BAYLISS, L.; FLORES-RIVERA, J.; FLEURY, A. Neurocysticercosis: mimics and chameleons. **Practical Neurology**, v. 19, p. 88-95, 2019. doi: 10.1136/practneurol-2017-001788.

DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, p. 79-86, 2003. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00058-5.

DUAN, H. L.; HE, Q. Y.; ZHOU, B.; WANG, W. W.; LI, B.; ZHANG, Y. Z.; DENG, Q. P.; ZHANG, Y. F.; YU, X. D. Anti-*Trimeresurus albolabris* venom IgY antibodies: preparation, purification and neutralization efficacy. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, p. 1-6, 2016. doi: 10.1186/s40409-016-0078-3.

EOM, K. S.; RIM, H. J. Morphological description of *Taenia asiatica* sp. n. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 31, p. 1-6, 1993. doi: 10.3347/kjp.1993.31.1.1.

ESPÍNDOLA, N. M.; IHA, A. H.; FERNANDES, I.; TAKAYANAGUI, O. M.; MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; MAIA, A. A. M.; PERALTA, J. M.; VAZ, A. J. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3178-3184, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.7.3178-3184.2005.

ESPÍNDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; PARDINI, A. X.; FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, p. 361-368, 2002. doi: 10.1179/000349802125001140.

- FARIA, L. S.; SOUZA, D. L. N.; RIBEIRO, R. P.; SOUSA, J. E. N.; BORGES, I. P.; ÁVILA, V. M. R.; FERREIRA-JÚNIOR, Á.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Highly specific and sensitive anti-*Strongyloides venezuelensis* IgY antibodies applied to the human strongyloidiasis immunodiagnosis. **Parasitology International**, v. 72, p.101933, 2019. doi: 10.1016/j.parint.2019.101933.
- FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; GONZAGA, H. T.; SANTOS, F. A.; FUJIMURA, P. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology Letters**, v. 172, p. 89-93, 2016. doi: 10.1016/j.imlet.2016.03.002.
- FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; SANTOS, F. A.; FUJIMURA, P. T.; GONZAGA, H. T.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Bacteriophage-fused peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **PloS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. 1-9, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0002792.
- 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. doi: 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. doi: 10.1046/j.1360-2276.2003.01132.x.
- FLEURY, A.; CARDENAS, G.; ADALID-PERALTA, L.; FRAGOSO, G.; SCIUTTO, E. Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 147-157, 2016. doi: 10.1111/pim.12299.
- FOGANG, Y. F.; SAVADOGO, A. A.; CAMARA, M.; TOFFA, D. H.; BASSE, A.; SOW, A. D.; MANSOUR, M.; NDIAYE, M. M. Managing neurocysticercosis: challenges and solutions. **International Journal of General Medicine**, v. 8, p. 333- 344, 2015. doi: 10.2147/IJGM.S73249.
- FRANÇOIS, A.; FAVENNEC, L.; CAMBON-MICHOT, C.; GUEIT, I.; BIGA, N.; TRON, F.; BRASSEUR, P.; HEMET, J. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, p. 488-492, 1998. doi: 10.1097/00000478-199804000-00015.
- 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. doi: 10.1139/z62-086.
- FREEMAN, R. S.; FALLIS, A. M.; SHEA, M.; MABERLEY, A. L.; WALTERS, J. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). II. The parasite. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, p. 493-495, 1973. doi: 10.4269/ajtmh.1973.22.493.
- GALÁN-PUCHADES, M. T.; FUENTES, M. V. Lights and shadows of the *Taenia asiatica* life cycle and pathogenicity. **Tropical Parasitology**, v. 3, p. 114-119, 2013. doi: 10.4103/2229-5070.122114.

GARCIA, H. H. Neurocysticercosis. **Neurologic Clinics**, v. 36, p. 851-864, 2018. doi: 10.1016/j.ncl.2018.07.003.

GARCIA, H. H.; DEL BRUTTO, O. H. Imaging findings in neurocysticercosis. **Acta Tropica**, v. 87, p. 71-78, 2003. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00057-3

GARCIA, E.; ORDOÑEZ, G.; SOTELO, J. Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 3324-3325, 1995. doi: 8586728.

GARCIA, H. H.; RODRIGUEZ, S.; FRIEDLAND, J. S. Immunology of *Taenia solium* taeniasis and human cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 388-396, 2014. doi: 10.1111/pim.12126.

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. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.11.001.

GNANASEKAR, M.; PADMAVATHI, B.; RAMASWAMY, K. Cloning and characterization of a novel immunogenic protein 3 (NIP3) from *Brugia malayi* by immunoscreening of a phage-display cDNA expression library. **Parasitology Research**, v. 97, p. 49-58, 2005. doi: 10.1007/s00436-005-1375-x.

GOMES, H. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Neurocisticercose. In: SALOMÃO, R. (Org.). **Infectologia: Bases Clínicas e Tratamento**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017, p. 232-239.

GONÇALVES, A. L.; NUNES, D. S.; GONÇALVES-PIRES, M. R.; UETA, M. T.; COSTA-CRUZ, J. M. Use of larval, parasitic female and egg antigens from *Strongyloides venezuelensis* to detect parasite-specific IgG and immune complexes in immunodiagnosis of human strongyloidiasis. **Parasitology**, v. 139, p. 956-961, 2012. doi: 10.1017/S0031182012000054.

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. doi: 10.1590/s0037-86822010000300008.

GÓNGORA-RIVERA, F.; SOTO-HERNÁNDEZ, J. L.; GUEVARA, P.; SOTELO-MORALES, J. In neurocysticercosis, CSF cytokines correlate with cerebral blood flow velocities. **Neurology**, v. 71, p. 1119-1122, 2008. doi: 10.1212/01.wnl.0000326961.34868.5b

GONZALES, I.; RIVERA, J. T.; GARCIA, H. H.; Cysticercosis working group in Peru. Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. **Parasite Immunology**, v. 38, p. 136-146, 2016. doi: 10.1111/pim.12307.

GREUNKE, K.; BRAREN, I.; ALPERS, I.; BLANK, S.; SODENKAMP, J.; BREDEHORST, R.; SPILLNER, E. Recombinant IgY for improvement of immunoglobulin-based analytical applications. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1237- 1244, 2008. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2008.07.004.

GRIPPER, L. B.; WELBURN, S. C. Neurocysticercosis infection and disease—A review. **Acta Tropica**, v. 166, p. 218-224, 2017. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.015.

GUARDA, K. X.; COSTA-CRUZ, J. M.; BARCELOS, I. S. C. Seroprevalence of human cysticercosis in Jataí, Goiás state. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 146-149, 2018. doi: 10.1016/j.bjid.2018.01.002.

HAMAMOTO FILHO, P. T.; ZANINI, M. A.; BOTTA, F. P.; RODRIGUES, M. V.; BAZAN, R.; VULCANO, L. C.; BIONDI, G. F. Development of an experimental model of neurocysticercosis-induced hydrocephalus. Pilot study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, p. 819-823, 2015. doi: 10.1590/S0102-865020150120000005.

HELDWEIN, K.; BIEDERMANN, H. G.; HAMPERL, W. D.; BRETZEL, G.; LOSCHER, T.; LAREGINA, D.; FROSCHE, M.; BUTTNER, D. W.; TAPPE, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with non-Hodgkin's lymphoma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 108-111, 2006. doi: 10.4269/ajtmh.2006.75.108.

HELL, R. C.; AMIM, P.; DE ANDRADE, H. M.; DE AVILA, R. A.; FELICORI, L.; OLIVEIRA, A. G.; OLIVEIRA, C. A.; NASCIMENTO, E.; TAVARES, C. A.; GRANIER, C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. **Clinical Immunology**, v. 131, p. 129-138, 2009. doi: 10.1016/j.clim.2008.10.012.

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

ISHIDA, M.M.I.; RUBINSKY-ELEFANT, G.; FERREIRA, A.W.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; VAZ, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross- reactivities in human infections and immunized animals. **Acta Tropica**, v. 89, p.73-84, 2003. doi: 10.1016/j.actatropica.2003.09.005.

JOLODAR, A.; FISCHER, P.; BERGMANN, S.; BÜTTNER, D. W.; HAMMERSCHMIDT, S.; BRATTIG, N. W. Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1627, p. 111-120, 2003. doi: 10.1016/s0167- 4781(03)00083-6.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H. LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v. 60, p. 341-348, 2004. doi: 10.1079/WPS200422.

KELVIN, E. A.; CARPIO, A.; BAGIELLA, E.; LESLIE, D.; LEON, P.; ANDREWS, H.; HAUSER, W. A. Seizure in people with newly diagnosed active or transitional neurocysticercosis. **Seizure**, v. 20, p. 119-125, 2011. doi: 10.1016/j.seizure.2010.10.036.

- KOBAYASHI, C.; YOKOYAMA, H.; NGUYEN, S.V.; KODAMA, Y.; KIMATA, T.; IZEKI, M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in *scid* mice. **Vaccine**, v. 23, p. 232-235, 2004. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.05.034.
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p.163-182, 2012. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101137.
- KRUMPE, L. R.; MORI, T. Potential of phage-displayed peptide library technology to identify functional targeting peptides. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, p. 525-537, 2007. doi: 10.1517/17460441.2.4.525.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. doi: 10.1038/227680a0.
- LANZILLOTTI, R.; COETZER, T.L. Phage display: a useful tool for malaria research? **Trends in Parasitology**, v. 24, p. 18-23, 2008. doi: 10.1016/j.pt.2007.09.007.
- 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. doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.282.
- LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S.; PARK, D. W.; JANG, S. I.; MORALES, A.; GARCÍA, D.; LUCIO, E.; LARIOS, R.; VICTORIA, G.; MARRUFO, D.; LILLEHOJ, E. P. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v. 88, p. 562-566, 2009. doi: 10.3382/ps.2008-00340.
- LEI, J. H.; GUAN, F.; XU, H.; CHEN, L.; SU, B. T.; ZHOU, Y.; WANG, T.; LI, Y. L.; LIU, W. Q. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 196-202, 2012. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.017.
- LESCANO, A. G.; ZUNT, J. Other cestodes: sparganosis, coenurosis and *Taenia crassiceps* cysticercosis. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 114, p. 335-345, 2013. doi: 10.1016/B978-0-444-53490-3.00027-3.
- LEVENHAGEN, M. A.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; CARNEIRO, A. P.; COSTA-CRUZ, J. M.; GOULART, L. R. Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of *Strongyloides* sp. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12181, 2015. doi: 10.1038/srep12181.
- LI, W. H.; QU, Z. G.; ZHANG, N. Z.; YUE, L.; JIA, W. Z.; LUO, J. X.; YIN, H.; FU, B. Q. Molecular characterization of enolase gene from *Taenia multiceps*. **Research in Veterinary Science**, v. 102, p. 53-58, 2015. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.06.013.
- LIU, L. N.; JING, F. J.; CUI, J.; FU, G. Y.; WANG, Z. Q. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with *Trichinella spiralis* by an IgY-IgM mAb sandwich ELISA. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 150-155, 2013. doi: 10.1016/j.exppara.2012.11.001.

- LOPES, C. A.; FARIA, L. S.; SOUSA, J. E. N.; BORGES, I. P.; RIBEIRO, R. P.; BUENO, L. L.; RODRIGUES ÁVILA, V. M.; FERREIRA JÚNIOR, Á.; COSTA-CRUZ, J. M. Anti-*Ascaris suum* immunoglobulin Y as a novel biotechnological tool for the diagnosis of human ascariasis. **Journal of Helminthology**, v. 94, p. e71, 2019. doi: 10.1017/S0022149X19000701.
- 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. doi: 14907713.
- LUNDSTRÖM, J.; SALAZAR-ANTON, F.; SHERWOOD, E.; ANDERSSON, B.; LINDH, J. Analyses of an expressed sequence tag library from *Taenia solium*, cysticercos. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e919, 2010. doi: 10.1371/journal.pntd.0000919.
- 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. doi: 10.1590/S0074-02762013000300016.
- 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. doi: 10.1111/j.1365- 3156.2007.01917.x.
- MALLA, N.; KAUR, R.; GANGULY, N. K.; SAWHNEY, I. M.; MAHAJAN, R. C. Utility of specific IgG4 response in saliva and serum samples for the diagnosis and follow up of human neurocysticercosis. **Nepal Medical College Journal**, v. 7, p. 1-9, 2005. doi: 16295711.
- 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. doi: 10.1111/j.1365- 3024.2011.01283.x.
- MARCILLA, A.; PÉREZ-GARCÍA, A.; ESPERT, A.; BERNAL, D.; MUÑOZ-ANTOLÍ, C.; ESTEBAN, J. G.; TOLEDO, R. *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning, and functional expression. **Experimental Parasitology**, v. 117, p. 57-64, 2007. doi: 10.1016/j.exppara.2007.03.011.
- 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. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.10.011.
- MATOS-SILVA, H.; RECIPUTTI, B. P.; DE PAULA, E. C.; OLIVEIRA, A. L.; MOURA, V. B. L.; VINAUD, M. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; LINO-JÚNIOR, R. S. Experimental encephalitis caused by *Taenia crassiceps* cysticerci in mice. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 70, p. 287-292, 2012. doi: 10.1590/s0004-282x2012005000010.

MEWARA, A.; GOYAL, K.; SEHGAL, R. Neurocysticercosis: A disease of neglect. **Tropical Parasitology**, v. 3, p. 106-113, 2013. doi: 10.4103/2229-5070.122111.

MICHELET, L.; FLEURY, A.; SCIUTTO, E.; KENDJO, E.; FRAGOSO, G.; PARIS, L.; BOUTEILLE, B. Human neurocysticercosis: comparison of different diagnostic tests using cerebrospinal fluid. **Journal Clinical Microbiology**, v. 49, p. 195-200, 2011. doi: 10.1128/JCM.01554-10.

MIMMI, S.; MAISANO, D.; QUINTO, I.; IACCINO, E. Phage display: an overview in context to drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 40, p. 87-91, 2019. doi: 10.1016/j.tips.2018.12.005.

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

MIRZAEI, M. K., MAURICE, C. F. Ménage à trois in the human gut: interactions between host, bacteria and phages. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 15, p. 397-408, 2017. doi: 10.1038/nrmicro.2017.30.

MOHAMED, M. R.; SHALABY, K. A.; LOVERDE, P. T.; ABD ALLAH, N. M.; KARIM, A. M. Cloning and characterization of a cDNA fragment encoding a *Schistosoma mansoni* actin-binding protein (Smfilamin). **Parasitology Research**, v. 102, p. 1035-1042, 2008. doi: 10.1007/s00436-007-0872-5.

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

MORALES, J.; DE ALUJA, A. S.; MARTÍNEZ, J. J.; HERNÁNDEZ, M.; ROSAS, G.; VILLALOBOS, N.; HERNÁNDEZ, B.; BLANCAS, A.; MANOUTCHARIAN, K.; GEVORKIAN, G.; CERVANTES, J.; DÍAZ, A.; FLEURY, A.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C.; SCIUTTO, E. Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: Simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 176, p. 53-58, 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.10.039.

MOURA, V. B.; LIMA, S. B.; MATOS-SILVA, H.; VINAUD, M. C.; LOYOLA, P. R.; LINO, R. S. Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. **Parasitology**, v. 143, p. 334,342, 2015. doi: 10.1017/S0031182015001572.

MÜLLER, 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. doi: 10.1186/s12937-015-0067-3.

MUNHOZ, L.; VARGAS, G.; FISCHER, G.; LIMA, M.; ESTEVES, P.; HÜBNER, S. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciência Rural**, v. 44, p. 153-160, 2014. doi: 10.1590/S0103-84782014000100025.

NASH, T. E.; DEL BRUTTO, O. H.; BUTMAN, J. A.; CORONA, T.; DELGADO-ESCUETA, A.; DURON, R. M.; EVANS, C. A.; GILMAN, R. H.; GONZALEZ, A. E.; LOEB, J. A.; MEDINA, M. T.; PIETSCH-ESCUETA, S.; PRETELL, E. J.; TAKAYANAGUI, O. M.; THEODORE, W.; TSANG, V. C.; GARCIA, H. H. Calcific neurocysticercosis and epileptogenesis. **Neurology**, v. 62, p. 1934–1938, 2004. doi: 10.1212/01.wnl.0000129481.12067.06.

NASH, T. E.; PRETELL, E. J.; LESCANO, A. G.; BUSTOS, J. A.; GILMAN, R. H.; GONZALEZ, A. E.; GARCIA, H.H.; Cysticercosis Working Group in Peru. Perilesional brain oedema and seizure activity in patients with calcified neurocysticercosis: a prospective cohort and nested case-control study. **The Lancet Neurology**, v. 7, p. 1099–1105, 2008. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70243-6.

NAVARRO, F.; MUNIESA, M. Phages in the human body. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00566.

NIE, G.; WANG, T.; LU, S.; LIU, W.; LI, Y.; LEI, J. Detection of *Clonorchis sinensis* circulating antigen in sera from Chinese patients by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. **PLoS One**, v. 9, p. e113208, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0113208.

NOREN, K.A.; NOREN, C.J. Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. **Methods**, San Diego, v. 23, p. 169-178, 2001. doi: 10.1006/meth.2000.1118.

NOYA, O.; PATARROYO, M. E.; GUZMÁN, F.; ALARCÓN DE NOYA, B. Immunodiagnosis of parasitic diseases with synthetic peptides. **Current Protein & Peptide Science**, v. 4, p. 299-308, 2003. doi: 10.2174/1389203033487153.

NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; RIBEIRO, V. S.; DA CUNHA, J. P. JR; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions obtained by ion-exchange chromatography: potential source of immunodominant markers applicable in the immunodiagnosis of human neurocysticercosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, p. 36-41, 2013. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.020.

NUNES, D. S; RIBEIRO, V. S; MANHANI, M. N; COSTA-CRUZ, J. M. Jacalin-unbound fraction of *Taenia saginata* in immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 258-264, 2010. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.06.016.

OLIVEIRA, H. B.; MACHADO, G. A.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; MOURA, L.P.; COSTA-CRUZ, J. M. Saline extract of *Taenia saginata* metacestodes as an alternative antigen for the immunodiagnosis of neurocysticercosis in human cerebrospinal fluid. **Parasitology Research**, v. 105, p. 169-174, 2009. doi: 10.1007/s00436-009-1379-z.

OLIVEIRA, H. B; MACHADO, G. A; MINEO, J. R; COSTA-CRUZ, J. M. *Taenia saginata* metacestode antigenic fractions without affinity to concanavalin A are an important source of specific antigens for the diagnosis of human neurocysticercosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 638-644, 2010. doi: 10.1128/CVI.00516-09.

O'NEAL, S. E.; FLECKER, R. H. Hospitalization frequency and charges for neurocysticercosis, United States, 2003-2012. **Emerging Infectious Disease**, v. 21, p. 969-976, 2015. doi: 10.3201/eid2106.141324.

- PANDE, J.; SZEWCZYK, M. M.; GROVER, A. K. Phage display: concept, innovations, applications and future. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 849-858, 2010. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004.
- PARDINI, A. X.; PERALTA, R. H.; VAZ, A. J.; MACHADO, L. R.; PERALTA, J. M. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 190-193, 2002. doi: 10.1128/cdli.9.1.190-193.2002.
- PEREIRA, E. P. V.; VAN TILBURG, M. F.; FLOREAN, E. O. P. T.; GUEDES, M. I. F. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 293-303, 2019. doi: 10.1016/j.intimp.2019.05.015.
- PHILLIPS, T. M. Immune complex assays: diagnostic and clinical application. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 27, p. 237-64, 1989. doi: 10.3109/10408368909105715.
- PIAO, J.; XU, C. L.; PIAO, J. A.; CAO, M.; HUANG, N.; JIN, M. Expression analysis of proteasome maturation protein (POMP) gene in Liaoning Cashmere goat. **Animal Biotechnology**, v. 7, p. 1-11, 2019. doi: 10.1080/10495398.2019.1596946.
- PRASAD, K. N.; VERMA, A.; SRIVASTAVA, S.; GUPTA, R. K.; PANDEY, C. M.; PALIWAL, V. K. An epidemiological study of asymptomatic neurocysticercosis in a pig farming community in northern India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, p. 531-536, 2011. doi: 10.1016/j.trstmh.2011.06.001.
- QU, J. X.; LIN, Y. H.; MA, R.S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polypeptide proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. **Protein Expression and Purification**, v. 75, p. 225-229, 2011. doi: 10.1016/j.pep.2010.10.003.
- RAIBAGKAR, P.; BERKOWITZ, A. L. The many faces of neurocysticercosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 390, p. 75-76, 2018. doi: 10.1016/j.jns.2018.04.018.
- RAJKOTIA, Y.; LESCANO, A. G.; GILMAN, R. H.; CORNEJO, C.; GARCIA, H. H. Economic burden of neurocysticercosis: results from Peru. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 101, p. 840-846, 2007. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.03.008.
- RAMACHANDRAN, S.; THOMPSON, R. W.; GAM, A. A.; NEVA, F. A. Recombinant cDNA clones for immunodiagnosis of strongyloidiasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 196-203, 1998. doi: 10.1086/513817.
- RASSY, D.; BOBES, R. J.; ROSAS, G.; ANAYA, V. H.; BREHM, K.; HERNÁNDEZ, B.; CERVANTES, J.; PEDRAZA, S.; MORALES, J.; VILLALOBOS, N.; DE ALUJA, A. S.; LACLETTE, J. P.; NUNES, C. M.; BIONDI, G. F.; FRAGOSO, G.; HERNÁNDEZ, M.; SCIUTTO, E. Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. **PLoS One**, v. 5, p. e11287, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0011287.

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

RIBEIRO, V. S.; MANHANI, M. N.; CARDOSO, R.; UEIRA-VIEIRA, C.; GOULART, L. R.; COSTA-CRUZ, J. M. Selection of high affinity peptide ligands for detection of circulating antibodies in neurocysticercosis. **Immunology Letters**, v. 129, p. 94-99, 2010. doi: 10.1016/j.imlet.2010.01.008.

RIBEIRO, V. S.; NUNES, D. S.; GONZAGA, H. T.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; COSTA-CRUZ, J. M. Diethylaminoethyl (DEAE) binding fraction from *Taenia solium* metacestode improves the neurocysticercosis serodiagnosis. **Parasitology Research**, v. 113, p. 2569-2575, 2014. doi: 10.1007/s00436-014-3908-7.

SALLES, B. C.; COSTA, L. E.; ALVES, P. T.; DIAS, A. C.; VAZ, E. R.; MENEZES-SOUZA, D.; RAMOS, F. F.; DUARTE, M. C.; ROATT, B. M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; TAVARES, C. A.; GONÇALVES, D. U.; ROCHA, R. L.; GOULART, L. R.; COELHO, E. A. *Leishmania infantum* mimotopes and a phage-ELISA assay as tools for a sensitive and specific serodiagnosis of human visceral leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 87, p. 219-225, 2017. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.012.

SAKO, Y.; TAKAYANAGUI, O. M.; ODASHIMA, N. S.; ITO, A. Comparative study of paired serum and cerebrospinal fluid samples from neurocysticercosis patients for the detection of specific antibody to *Taenia solium* immunodiagnostic antigen. **Tropical Medicine Health**, v. 43, p. 171-176, 2015. doi: 10.2149/tmh.2015-04.

SCHEEL, C.M.; KHAN, A.; HANCOCK, K.; GARCIA, H.H.; GONZALEZ, A.E.; GILMAN, R.H.; TSANG, V.C.W and The Cysticercosis Working Group In Peru. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kd proteins: Comparison of assay formats. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 771- 776, 2005. doi: 16222024.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity of alternative adjuvants in comparison to Freund's complete adjuvant. **ALTEX**, v. 13, p. 22-25, 1996. doi: 11178467.

SCIUTTO E.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 79-80, 2011. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x.

SHIN, J. H.; YANG, M.; NAM, S. W.; KIM, J. T.; MYUNG, N. H.; BANG, W. G.; ROE, I. H. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 1061-1066, 2002. doi: 10.1128/cdli.9.5.1061-1066.2002.

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. doi: 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. doi: 10.1590/S0036-46652002000400009.

SINGH, G.; RAJSHEKHAR, V.; MURTHY, J. M.; PRABHAKAR, S.; MODI, M.; KHANDELWAL, N.; GARCIA, H. H. A diagnostic and therapeutic scheme for a solitary cysticercus granuloma. **Neurology**, v. 75, p. 2236-2245, 2010. doi: 10.1212/WNL.0b013e31820202dc.

SIOUD, M. Phage display libraries: From binders to targeted drug delivery and human therapeutics. **Molecular Biotechnology**, v. 61, p. 289-303, 2019. doi: 10.1007/s12033-019-00156-8.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985. doi: 10.1126/science.4001944.

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

SORVILLO, F.; WILKINS, P.; SHAFIR, S.; EBERHARD, M. Public health implications of cysticercosis acquired in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1-6, 2011. doi: 10.3201/eid1701.101210.

SOTELO, J.; MARIN, C. Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. **Journal of Neurosurgery**, v. 66, p. 686-689, 1987. doi: 10.3171/jns.1987.66.5.0686.

SOTELO, J.; GUERRERO, V.; RUBIO, F. Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. **Archives of Internal Medicine**, v. 145, p. 442-445, 1985. doi: 10.1001/archinte.1985.00360030074016.

SUZUKI, L. A.; ARRUDA, G. C.; QUAGLIATO, E. M.; ROSSI, Q. L. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for immunodiagnosis of neurocysticercosis using ELISA on cerebrospinal fluid samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 152-155, 2007. doi: 10.1590/s0037-86822007000200002.

TAKAYANAGUI, O. M.; LEITE, J. P. Neurocisticercose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 283-290, 2001. doi: 10.1590/s0037-86822001000300010.

TAKAYANAGUI, O. M.; CASTRO E SILVA, A. A.; SANTIAGO, R. C.; ODASHIMA, N. S.; TERRA, V. C.; TAKAYANAGUI, A. M. Compulsory notification of cysticercosis in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 54, p. 557-564, 1996. doi: 10.1590/s0004-282x1996000400002.

TEIMOORI, S.; ARIMATSU, Y.; LAHA, T.; KAEWKES, S.; SEREERAK, P.; SRIPA, M.; TANGKAWATTANA, S.; BRINDLEY, P. J.; SRIPA, B. Chicken IgY-based coproantigen capture ELISA for diagnosis of human opisthorchiasis. **Parasitology International**, v. 66, p. 443-447, 2017. doi: 10.1016/j.parint.2015.10.011.

TELLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNANDEZ-RONQUILLO, L. Epidemiology of neurocysticercosis and epilepsy, is everything described? **Epilepsy & Behavior**, v. 76, p. 146-150, 2017. doi: 10.1016/j.yebeh.2017.01.030.

THIRUMALAI, D.; VISAGA, A. M. B. I. S.; VIEIRA-PIRES, R. S.; XIAOYING, Z.; SEKARAN, S.; KRISHNAN, U. Chicken egg yolk antibody (IgY) as diagnostics and therapeutics in parasitic infections - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 755-763, 2019. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.06.118.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v. 131, p. 569-574, 2002. doi: 10.1016/s1095-6433(01)00508-6.

TOGORO, S. Y.; SOUZA, E. M.; SATO, N. S. Diagnóstico laboratorial da neurocisticercose: revisão e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 345-355, 2012. doi: 10.1590/S1676-24442012000500007.

TORRE-ESCUADERO, E.; MANZANO-ROMÁN, R.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R.; SILES-LUCAS, M.; OLEAGA, A. Cloning and characterization of a plasminogen-binding surface-associated enolase from *Schistosoma bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 76-84, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.011.

TUERO, I.; PALMA, S.; CABEZA, F.; SALEEMI, S.; RODRIGUEZ, S.; GONZALES, I.; MAYTA, H.; MAHANTY, S.; GARCIA, H. H.; GILMAN, R. H.; Cysticercosis Working Group in Perú. A Comparative study of peripheral immune responses to *Taenia solium* in individuals with parenchymal and subarachnoid neurocysticercosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0004143, 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0004143.

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

VAZ, A. J.; LIVRAMENTO, J. A. Neurocisticercose. In: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S.L.M. (Eds.). **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 20, p. 177-184.

VAZ, A.J.; NUNES, C.M.; PIAZZA, R.M.E.; LIVRAMENTO, J.A.; SILVA, M.V.; NAKAMURA, P.M.; FERREIRA, A.W. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 354-357, 1997. doi: 10.4269/ajtmh.1997.57.354.

VICTOR, B.; DORNY, P.; KANOBANA, K.; POLMAN, K.; LINDH, J.; DEELDER, A. M.; PALMBLAD, M.; GABRIËL, S. Use of expressed sequence tags as an alternative approach for the identification of *Taenia solium* metacestode excretion/secretion proteins. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 1-8, 2013. doi: 10.1186/1756-0500-6-224.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, p. 523-532, 2008. doi: 10.1038/nri2343.

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. doi: 10.5604/17331331.1197285.

WHITE, A.C. Jr. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 187-206, 2000. doi: 10.1146/annurev.med.51.1.187.

WHITE, A. C. Jr.; GARCIA, H. H. Updates on the management of neurocysticercosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, p. 377-382, 2018. doi: 10.1097/QCO.0000000000000480.

World Health Organization (WHO). Taeniasis/cysticercosis – 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>. Acesso em: 20 dez.2019.

World Health Organization (WHO). DALYS. Disponível em: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/. Acesso em: 07 jan.2020.

WILLMS, K. Morphology and biochemistry of the pork tapeworm, *Taenia solium*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 375-382, 2008. doi: 10.2174/156802608783790875.

WILLMS, K.; ZURUBIAN, R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. **Parasitology**, v. 137, p. 335-346, 2010. doi: 10.1017/S0031182009991442.

WU, C. H.; LIU, I. J.; LU, R. M.; WU, H. C. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, p. 1-14, 2016. doi: 10.1186/s12929-016-0223-x.

WÜNSCHMANN, A.; GARLIE, V.; AVERBECK, G.; KURTZ, H.; HOBERG, E. P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 484-488, 2003. doi: 10.1177/104063870301500517.

YANG, J.; QIU, C.; XIA, Y.; YAO, L.; FU, Z.; YUAN, C.; FENG, X.; LIN, J. Molecular cloning and functional characterization of *Schistosoma japonicum* enolase which is highly expressed at the schistosomulum stage. **Parasitology Research**, v. 107, p. 667-677, 2010. doi: 10.1007/s00436-010-1913-z.

ZAMBRANO-MILA, M. S.; BLACIO, K. E. S.; VISPO, N. S. Peptide phage display: molecular principles and biomedical applications. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science**, v. 28, p. 2168479019837624, 2019. doi: 10.1177/2168479019837624.

ZHANG, S.; GUO, A.; ZHU, X.; YOU, Y.; HOU, J.; WANG, Q.; LUO, X.; CAI, X. Identification and functional characterization of alpha-enolase from *Taenia pisiformis* metacestode. **Acta Tropica**, v. 144, p. 31-40, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.01.007.

ZHANG, X.; CALVERT, R. A.; SUTTON, B. J.; DORÉ, K. A. IgY: a key isotype in antibody evolution. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, p. 2144-2156, 2017. doi: 10.1111/brv.12325.

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**, v. 53, p. 656-661, 1990. doi: 10.1136/jnnp.53.8.656.